



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Daniela Marić Pfannkuchen

**Potencijalno toksične dijatomeje roda
Pseudo-nitzschia u sjevernom Jadranu:
ekološke, taksonomske i molekularne
značajke**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF GEOLOGY

Daniela Marić Pfannkuchen

**Potentially toxic diatom genus
Pseudo-nitzschia in the northern Adriatic
Sea: ecological, taxonomic and molecular
features**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Daniela Marić Pfannkuchen

**Potencijalno toksične dijatomeje roda
Pseudo-nitzschia u sjevernom Jadranu:
ekološke, taksonomske i molekularne
značajke**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Robert Precali

Zagreb, 2013.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Daniela Marić Pfannkuchen

**Potencijalno toksične dijatomeje roda
Pseudo-nitzschia u sjevernom Jadranu:
ekološke, taksonomske i molekularne
značajke**

DOKTORSKI RAD

*Predložen Vijeću poslijediplomskog studija oceanologije,
Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja akademskog stupnja doktora
prirodnih znanosti, grana znanost o moru*

Zagreb, 2013.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru i voditelju laboratorija dr. sc. Robertu Precaliju na podršci, razumijevanju, savjetima i slobodi koju mi je pružio u mom znanstvenom radu i napredovanju

Veliko hvala dr. sc. Nenadu Smodlaku koji me usmjerio na istraživanje fitoplanktona, vjerovao u mene, pomogao mi svojim savjetima i bio podrška bezbroj puta

Zahvaljujem se dr. sc. Danilu Degobbisu i dr.sc. Renatu Batelu na potpori i savjetima

Zahvaljujem se Anici Bakota koja me uvela u svijet fitoplanktona koji je za mene i danas čaroban kao i prvog dana

Zahvaljujem se profesoru dr. sc. Damiru Viličiću na prvim podacima koje mi je nesebično ustupio, savjetima, podršci i suradnji

*Hvala...doc. dr. sc. Zrinki Ljubešić koja me usmjerila prema istraživanju roda *Pseudo-nitzschia*, i bila prijateljica i kolegica u najtežim i najljepšim trenucima mog života*

Zahvaljujem dr. sc. Ivani Ujević i Jasni Arapov, dipl. ing., za određivanje domoične kiseline u kulturama

BGBM i dr.sc. Regini Jahn u čijem sam laboratoriju naučila molekularne metode i provela beskrajne sate na elektronskom mikroskopu...kojeg su nam kasnije i poklonili

Zahvaljujem Jasni na brojnim živim uzorcima koje je brižno skupljala i donosila na Institut poslije svakog terena...Giti, Darku, Paolu na njihovoj tehničkoj pomoći i ostalim kolegama iz Laboratorija za savjete, suradnju, pomoć pri uzorkovanju

Zahvaljujem kolegama s poslijediplomskog doktorskog studija oceanologije, Vedranu, Jeleni, Tini, Sandi, Mirti, Ugu, Paolu, Marinu na zajedničkim raspravama, izmjenjivanju iskustava o položenim ispitima i nesebičnoj pomoći kad god je bilo potrebno

Zahvaljujem Alemki na lektoriranju teksta

Zahvaljujem članovima povjerenstva doc. dr. sc. Zrinki Ljubešić, dr. sc. Živani Ninčević Gladan i dr. sc. Blaženki Gašparović na korisnim savjetima i brzini pri ispravljanju i poboljšanju ovog rukopisa

Jeleni Godrijan, koja je bila moj suputnik na ovom putovanju, uvijek pravi prijatelj, jaka ili nježna kada je to trebalo...s kojom sam provela beskrajne sate mikroskopirajući, radeći u laboratoriju, diskutirajući...

Mojim roditeljima i bratu Borisu na beskonačnom strpljenju i razumijevanju tijekom svih godina moga školovanja

Na kraju veliko hvala Martinu koji je vjerovao u mene, nesebično mi pomagao svojim savjetima i iskustvom, kao kolega, prijatelj i partner sve ove godine, te bio pun razumijevanja i podrške u najtežim i najljepšim trenucima ovog putovanja

...mojoj maloj djevojčici...

Disertacija je izrađena u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom dr. sc. Roberta Precalija, u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog studija Oceanologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Potencijalno toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke

Daniela Marić Pfannkuchen
Centar za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković

SAŽETAK

Uzorci fitoplanktona na području sjevernog Jadrana sakupljani su na dvije postaje, RV001 i SJ107, od 1972. do 2009. godine. Analiza ovog tridesetsedmogodišnjeg niza podataka omogućila je značajne spoznaje o dinamici fitoplanktona, višegodišnjim ciklusima, sukcesiji vrsta, te promjenama unutar fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana. Ustanovljeno je da se abundancija ukupnog fitoplanktona, dijatomeja i nanofitoplanktona značajno smanjila nakon 2000-te godine, te je došlo do promjena u sastavu vrsta i razdobljima cvjetanja. Vrste roda *Pseudo-nitzschia* dominirale su fitoplanktonskom zajednicom tijekom čitavog istraživnog razdoblja, a opažena je promjena u sastavu vrsta unutar roda. Krajem osamdesetih godina prošlog stoljeća fitoplanktonskom zajednicom sjevernog Jadrana dominirale su vrste iz grupe *P. seriata*, dok se grupa *P. delicatissima* po prvi put pojavila u 1978. i od tada joj učestalost pojavljivanja stalno raste. Grupa *P. delicatissima* u razdoblju od 1993.-2010. ima učestalost pojavljivanja od 76-97 %. Posljednjih godina praćena su ekološka, morfološka i toksična svojstva roda *Pseudo-nitzschia*, a sustavno su uzimani i uzorci za kulture koje su taksonomski i molekularno okarakterizirane. Na osnovi detaljnijih morfoloških obilježja: broja strija i fibula, strukture areola, postojanju ili izostanku središnje pore za sada je potvrđeno postojanje sedam vrsta *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu. Određene su tri vrste iz *P. seriata* grupe i to su: *P. fraudulenta*, *P. pungens* i *P. subfraudulenta*, te četiri vrste iz grupe *P. delicatissima* i to su: *P. manii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* i *P. calliantha*. Rod *Pseudo-nitzschia* specifičan je i po tome što neke vrste imaju mogućnost sinteze domoične kiseline (DK), snažnog neurotoksina. Posebna pažnja posvećena je potencijalno toksičnoj vrsti *P. calliantha* koja je dominirala 2007. Većina pronađenih vrsta potvrđena je i molekularnim metodama sa različitim genetičkim markerima (18S, ITS1-5,8S-ITS2, 28S). Napravljene su analize sličnosti, filogenetske rekonstrukcije i analize populacija vrsta *Pseudo-nitzschia*. Regija ITS1-5,8S-ITS2 omogućila je analizu populacija, te je statističkom analizom parsimonije određeno i njihovo geografsko i evolucijsko podrijetlo. Najznačajniji rezultati pokazuju da su populacije iz sjevernog Jadrana autohtone i genetički odvojene od populacija iz Sredozemlja i ostalih regija diljem svijeta.

(195 stranica, 63 slike, 23 tablice, 182 literaturna navoda, 6 priloga, izvornik na hrvatskom jeziku). Rad je pohranjen u knjižnici Instituta Ruđer Bošković.

Ključne riječi: fitoplankton, *Pseudo-nitzschia*, ekologija, taksonomija, filogenija, 18S, ITS1-5,8S-ITS2, 28S

Mentor: dr. sc. Robert Precali, znanstveni savjetnik

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

dr. sc. Živana Ninčević Gladan, znanstvena savjetnica

doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić,

dr. sc. Blaženka Gašparović, znanstvena savjetnica

Rad prihvaćen: 10. svibnja 2013. godine

Potentially toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the northern Adriatic Sea: ecological, taxonomic and molecular features

Daniela Marić Pfannkuchen
Centar for marine research, Rudjer Bošković Institute

ABSTRACT

Phytoplankton samples were collected at two stations, RV001 and SJ107, in the northern Adriatic Sea from 1972 to 2009. The analysis of this 37 years long data set provided significant insights in the phytoplankton dynamics, species succession and changes in the phytoplankton community. It was found that the total abundance of phytoplankton, diatoms and nanophytoplankton significantly decreased after the year 2000, and a change in the species composition and blooming periods has been observed. Species from the genus *Pseudo-nitzschia* were among the most abundant and most frequent diatoms during the entire investigated period. Changes in the species composition within the genus have been observed. In the 1980ies the phytoplankton community was dominated by the *P. seriata* group. While the group *P. delicatissima* first appeared in the '80s and since then their frequency continuously increased. *P. delicatissima* has a frequency of appearance from 76-97% in the period from 1993-2010. Morphological, ecological and toxic properties of the genus *Pseudo-nitzschia* were studied in the recent years in the northern Adriatic. Monoclonal cultures were established for taxonomical and molecular identification. The existence of 7 different *Pseudo-nitzschia* species is confirmed in the northern Adriatic on the basis of detailed morphological characteristics. Three in the *P. seriata* group: *P. fraudulenta*, *P. pungens* and *P. subfraudulenta*, and four species in *P. delicatissima* group: *P. mannii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* and *P. calliantha*. The genus *Pseudo-nitzschia* is associated with the production of domoic acid (DA), a strong neurotoxin. Special attention was given to a potentially toxic *P. calliantha* that dominated the bloom in 2007. Most of the identified species were confirmed by molecular methods with different genetic markers (18S, ITS1-5.8S-ITS2, 28S). Similarity representation after Neighbourjoining analysis, most parsimonious phylogenetic reconstruction and analysis of populations confirmed that populations from the Northern Adriatic are separated and genetically different from the rest of the Mediterranean and the world (ITS1-5.8S-ITS2). It could be demonstrated that the investigated *Pseudo-nitzschia* populations of the northern Adriatic are indigenous and genetically separated from populations in the Mediterranean and other regions of the world.

(195 pages, 63 figures, 23 tables, 182 references, 6 attachments, original in Croatian)
Thesis deposited in the library of the Rudjer Bošković Institute in Zagreb and Rovinj

Key words: phytoplankton, *Pseudo-nitzschia*, ecology, taxonomy, filogeny, 18S, ITS1-5.8S-ITS2, 28S

Supervisor: dr. sc. Robert Precali

Reviewers:
dr. sc. Živana Ninčević Gladan,
doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić,
dr. sc. Blaženka Gašparović

Thesis accepted: 10th May 2013

SADRŽAJ

1	Uvod	1
1.1	Rod <i>Pseudo-nitzschia</i>	1
1.2	Morfologija stanice <i>Pseudo-nitzschia</i>	2
1.3	Taksonomija	5
1.4	Molekularna taksonomija i filogenija.....	7
1.5	Životni ciklus.....	10
1.6	Domoična kiselina	13
1.6.1	Fiziologija proizvodnje domoične kiseline	14
1.6.2	Domoična kiselina u hranidbenom lancu	16
2	Pregled dosadašnjih istraživanja.....	20
2.1	Ciljevi i hipoteze.....	22
3	Materijali i metode.....	24
3.1	Područje istraživanja.....	24
3.2	Prikupljanje uzoraka	26
3.3	Mjerenje temperature i saliniteta	29
3.4	Određivanje koncentracije klorofila <i>a</i>	29
3.5	Određivanje koncentracije hranjivih soli.....	29
3.6	Određivanje abundancije i taksonomskog sastava fitoplanktona	30
3.7	Elektronska mikroskopija	31
3.8	Izolacija kultura	32
3.9	Molekularne metode	32
3.9.1	Izdvajanje genomske DNA	33
3.9.2	Lančana reakcija polimerazom - PCR.....	33
3.9.3	Analiza sekvenci	35
3.9.4	Statistička analiza parsimonije - SAP	35

3.10	Određivanje domoične kiseline u kulturama	36
3.11	Statistička obrada podataka	37
3.11.1	Kumulativna analiza saliniteta	37
3.11.2	Analiza prijelomnih razdoblja	37
3.11.3	Analiza glavnih komponenti	38
3.11.4	Korelacije i indeksi diverziteta	38
4	Rezultati	40
4.1	Raspodjela po godinama	40
4.2	Određivanje razdoblja	48
4.3	Analiza prijelomnih razdoblja	53
4.4	Korelacije abundancije fitoplanktona i ekoloških parametara – PCA	55
4.5	Sezonska raspodjela abundancije fitoplanktona - usporedba dva razdoblja	57
4.5.1	Ukupni fitoplankton	57
4.5.2	Dijatomeje	59
4.5.3	Dinoflagelati	60
4.5.4	Mikroplankton	60
4.5.5	Nanofitoplankton	62
4.6	Taksonomski sastav zajednice	63
4.7	Raznolikost i bogatstvo vrsta	67
4.8	Ekologija i dinamika cvjetanja roda <i>Pseudo-nitzschia</i> u sjevernom Jadranu	70
4.8.1	Vremenska raspodjela	70
4.8.2	Sezonska raspodjela	74
4.9	Ekološke i taksonomske značajke vrsta roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	76
4.9.1	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	77
4.9.2	<i>Pseudo-nitzschia subfraudulenta</i>	79
4.9.3	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	81
4.9.4	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	83

4.9.5	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	84
4.9.6	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	86
4.9.7	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	88
4.10	Cvjetanje vrste <i>P. calliantha</i> u sjevernom Jadranu	91
4.10.1	Prostorna raspodjela	91
4.10.2	Ekološki čimbenici	92
4.10.3	Korelacije ekoloških čimbenika i abundancije.....	93
4.11	Molekularne značajke regije 18S	95
4.12	Molekularne značajke regije ITS1-5,8S-ITS2.....	98
4.12.1	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	98
4.12.2	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	100
4.12.3	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	102
4.12.4	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	104
4.13	Molekularne značajke regije 28S	106
4.14	Analiza populacija molekularnim markerima	109
4.14.1	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	109
4.14.2	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	110
4.14.3	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	111
4.14.4	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	112
5	Rasprava	115
5.1	Određivanje razdoblja.....	115
5.2	Sustavni pomaci u abundanciji fitoplanktona.....	116
5.3	Korelacije fitoplanktona i okolišnih parametara – PCA.....	118
5.4	Pomaci u sezonskoj raspodjeli fitoplanktona	119
5.5	Sastav zajednice i indeksi raznolikosti	121
5.6	Ekologija i dinamika cvjetanja roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	124
5.7	Ekološke i taksonomske značajke vrsta <i>Pseudo-nitzschia</i> iz Jadrana	126

5.7.1	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	126
5.7.2	<i>Pseudo-nitzschia subfraudulenta</i>	126
5.7.3	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	127
5.7.4	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	128
5.7.5	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	128
5.7.6	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	129
5.7.7	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	130
5.8	Molekularne značajke regije 18S	133
5.9	Molekularne značajke regije ITS1-5,8S-ITS	134
5.9.1	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	134
5.9.2	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	135
5.9.3	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	136
5.9.4	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	136
5.10	Molekularne značajke regije 28S	137
5.11	Analiza populacija molekularnim markerima	138
5.11.1	<i>Pseudo-nitzschia mannii</i>	138
5.11.2	<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	139
5.11.3	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	139
5.11.4	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	141
6	Zaključci	143
7	Popis literature	147
8	Prilozi	XI
9	Životopis	XVI
10	Popis objavljenih radova	XIX

Tablica 1.1. Kazalo stranih riječi i izraza korištenih u radu

Puno ime	Engleski ili <i>latinski naziv</i>	kratica/jedinica
Abundancija (brojnosna koncentracija)	Numeric concentration	$A(\text{stanica})/L^{-1}$
Algoritam najbližih susjeda	Neighbour-joining algorithm	NJ
Amnezijsko trovanje školjkašima	Amnesic Shellfish Poisoning	ASP
Analiza glavnih komponenti	Principal Component Analysis	PCA
Pomak sustava	Regime shift	RS
Bogatstvo vrsta	Margalef indeks	d
Domoićna kiselina	Domoic acid	DK
Dvostruke strije	Biserate	
Indeks raznolikosti	Shannon-Wienerov indeks	H
Istarska Obalna Protustruja	Istrian Coastal Countercurrent	ICCC
Istočna Jadranska Struja	Eastern Adriatic Current	EAC
Lančana reakcija polimerazom	Polymerase Chain Reaction	PCR
Mala ribosomska podjedinica	Small ribosomal subunit	SSU
Najizglednija filogenetska rekonstrukcija	Maximum likelihood analysis	ML
Silicijevi mostovi-fibule	<i>fibulae</i>	F
Središnja pora	<i>porus centralis</i>	PC
Središnji čvor	<i>nodulus centralis</i>	NC
Statistička analiza parsimonije	Statistical parsimony analysis	SPA
Strije-silicijeve trake	<i>striae</i>	S
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	High-performance liquid chromatography	HPLC
Trovanje domoičnom kiselinom	Domoic Acid Poisoning	DAP
Unutarnja transkribirajuća razmaknica	Internal transcribed spacer	ITS
Velika ribosomska podjedinica (28S)	Large ribosomal subunit	LSU
Zapadna Jadranska Struja	Western Adriatic Current	WAC

Abundancija (A) fitoplanktona u ovom radu je definirana kao brojnosna koncentracija fitoplanktona, diatomeja, dinoflagelata u litri morske vode. Njena jedinica je stanica L^{-1} .

1. UVOD

1 UVOD

1.1 ROD *PSEUDO-NITZSCHIA*

Vrste roda *Pseudo-nitzschia* (Peragallo i Peragallo, 1900) penatne su dijatomeje kozmopolitskog rasprostranjenja, pronađene učestalo i često s visokim abundancijama u gotovo svim morskim i estuarijskim ekosustavima. Trenutno je poznato 37 vrsta iz roda, a kod 14 je dokazana mogućnost sinteze domoične kiseline (DK), snažnog neurotoksina (Lelong i sur., 2012). U određenim uvjetima pojedine vrste roda *Pseudo-nitzschia* luče DK, te se ona akumulira u školjkašima-filtratorima, a pronađena je i u tkivima organizmima viših trofičkih razina. Trovanje DK naziva se amnezijско trovanje školjkašima (engl. *Amnesic Shellfish Poisoning* - ASP). Neurotoksično djelovanje DK se kod ljudi pojavljuje kao glavobolja, smetenost i gubitak pamćenja. Trajno se oštećuju neuroni u hipotalamusu i amigdalnom području.

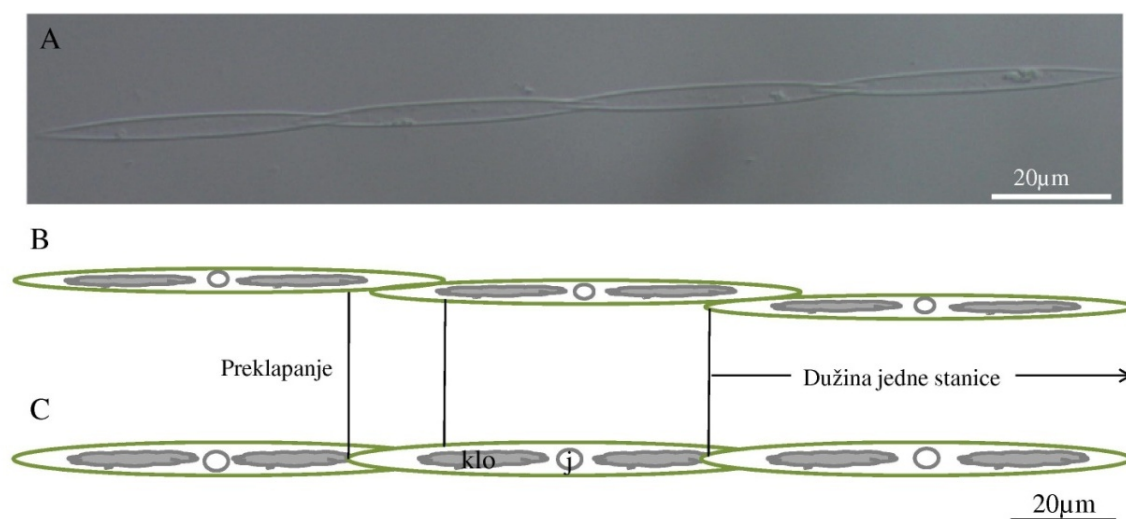
Pseudo-nitzschia i DK postali su predmetom intenzivnih znanstvenih istraživanja nakon 1987. kada je u Kanadi troje ljudi umrlo od posljedica trovanja DK-om (Bates i sur., 1989; 1990). Iako se rod *Pseudo-nitzschia* intenzivno istraživao u posljednjih 25 godina mnogo je toga ostalo neobjašnjeno, posebice taksonomija i sinteza toksina, te interakcije u hranidbenom lancu.

Analiza rezultata dobivenih molekularnim metodama otkriva puno višu razinu raznolikosti unutar prirodnih populacija koja se ne može otkriti samo morfološkim karakteristikama i tradicionalnim metodama, a može rasvijetliti postojanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta, varijetete, te dinamiku populacija.

Pseudo-nitzschia je prisutna u fitoplanktonu sjevernog Jadrana tijekom čitave godine, te često dostiže visoku abundanciju. Obično se javlja nekoliko cvjetanja godišnje za koja se pretpostavlja da su uzorkovana različitim vrstama. Točan sastav vrsta još nije poznat, što otvara brojna pitanja, kao i potrebu za daljnjim istraživanjima koja treba poduprijeti novim modernim metodama.

1.2 MORFOLOGIJA STANICE *PSEUDO-NITZSCHIA*

Dijatomeje (*lat. Bacillariophyceae, Diatomeae*) pripadaju skupini protista. Stanice dijatomeja nemaju staničnu stjenku već modifikaciju periplasta. Ispod plazmaleme periplasta nalaze se vezikule u kojima se sintetizira amorfn i netopljivi opal ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$) iz netopljivog silicija, koji je u moru prisutan u obliku ortosilicijeve kiseline (H_4SiO_4) i njezinih polimera. Naslage opala se u vezikulama povećavaju i izbijaju na vanjsku stranu stanice. Konačno opal (kremen) obavija čitavu stanicu u obliku opalne „kućice“ s dvjema ljušturicama. Ljušturica (*frustula*) se sastoji od dva dijela (*valve*), od kojih veći dio, kao poklopac kutije, pokriva manji dio. Valve mogu biti različitih oblika (okrugle, eliptične, stožaste ili valovite), a bočno su položene u *pleure*. *Pleure* gornjeg i donjeg dijela ljušturice stvaraju pojas. Diatomeje imaju velike vakuole zapremajući 90 % staničnog prostora. S obzirom na strukturu ljušturice dijelimo ih na *Centricae* koje imaju radijalnu strukturu u odnosu na središnju točku i pretežno su planktonski oblici i *Pennatae* koje su izdužene i prevladavaju u bentosu.



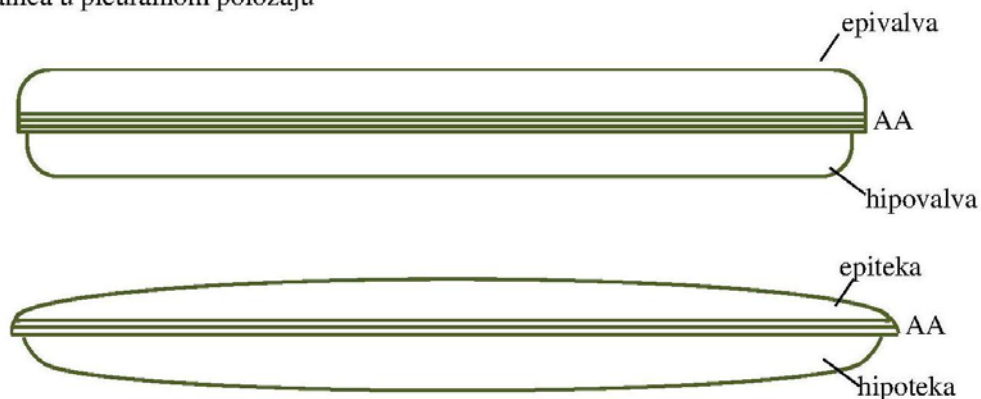
Slika 1.1. Lanac stanica vrste *Pseudo-nitzschia* spp. (A) fotografija sa svjetlosnog mikroskopa. (B) crtež u pleuralnom položaju. (C) crtež u valvarnom položaju; klo = kloroplast; j = jezgra.

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* pripadaju redu Pennales, odnosno dijatomejama s bilateralno simetričnim stanicama. Stanice su pojedinačne ili se drže međusobno apikalnim dijelovima stanice i tvore lance. Obično su ravne poput igle ili sigmoidalne. U valvarnom položaju stanice mogu imati lanceolatni do linearni oblik sa zaobljenim ili

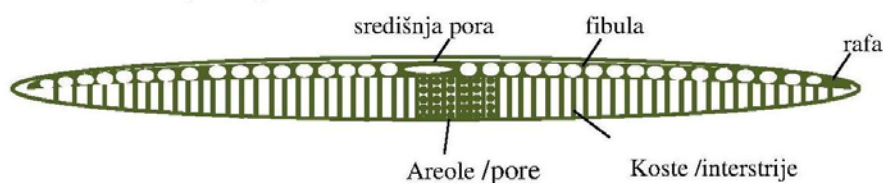
šiljastim krajevima. U pleuralnom položaju (presjek kroz apikalnu ravninu) imaju fuziformni do pravokutni oblik, obično posjeduju dva kloroplasta sa svake strane stanične jezgre (Slike 1.1 i 1.2.).

Sve vrste imaju rubno/bočno položenu rafu. Rafe je posjekotina koja se pruža duž cijele dužine valve. Rafe dviju valva na suprotnim su stranama (simetrija tipa *Nitzschia*). Rafe može biti prekinuta u sredini valve s središnjom porom (*porus centralis*) u ojačanom središnjem dijelu valve (središnjem čvoru, *nodulus centralis*; Slike 1.2. i 1.3.). S unutrašnje strane rafa je premošćena silicijevim mostovima, fibulama (*fibulae*), pa se tako stvara rafa s kanalom. Fibule se katkada protežu poprijeko. Rod *Pseudo-nitzschia* razlikuje se od roda *Nitzschia* po strukturi valve u području rafe, te po strukturi na pleuralnoj strani stanice (Slika 1.5.).

1. Stanica u pleuralnom položaju



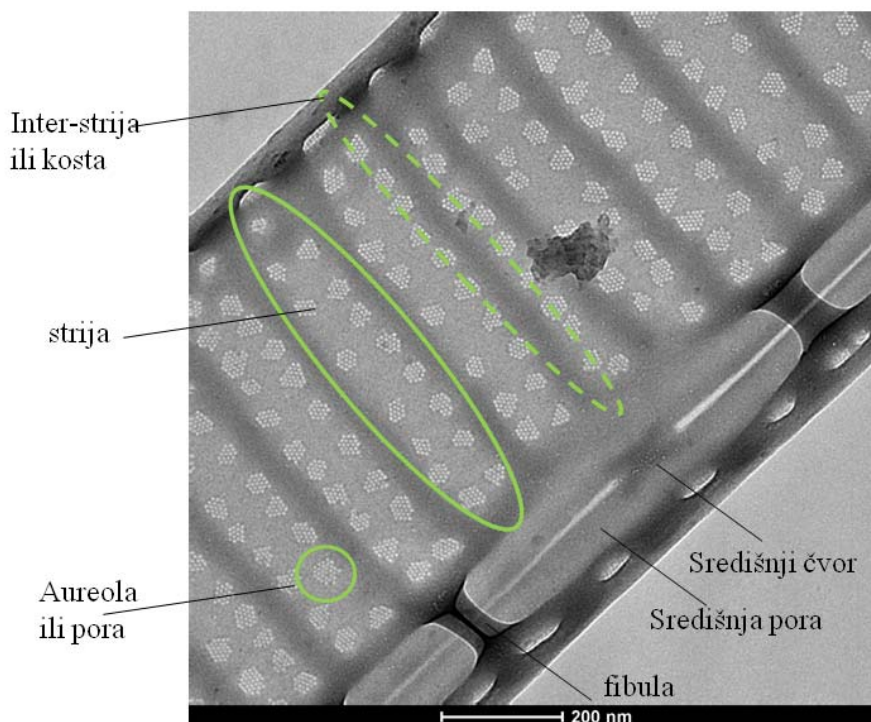
2. Stanica u valvalnom položaju



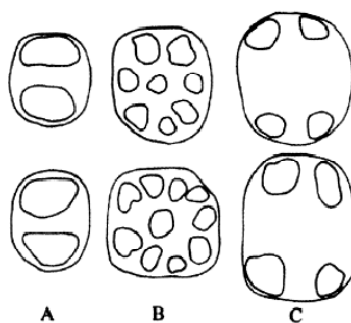
Slika 1.2. Morfologija stanice iz roda *Pseudo-nitzschia*. 1) stanica u pleuralnom položaju (presjek kroz apikalnu ravninu-AA) i 2) stanica u valvalnom položaju. AA, apikalna os.

Valve su ukrašene strijama, slabo silificiranim trakama koje po sebi imaju male pore. Strije se izmjenjuju sa jače silificiranim trakicama, interstrijama ili kostama. Strije su također važno morfološko obilježje ovoga roda. Razlikujemo strije s jednim redom areola i nazivamo ih uniseriatnim ili više redova areola (između dvije interstrije/koste) i

nazivamo ih multiserijatne. Primjer za uniserijatne vrste su *P. pungens*, *P. calliantha* dok za multiserijatne su vrste *P. frudelenta*, *P. multiseriis* i druge.



Slika 1.3. *Pseudo-nitzschia deliactissima*. Na mikrografiji elektronskog mikroskopa (TEM) označeni su dijelovi stanice koji su važni za određivanje vrste.



Slika 1.4. Razlike u strukturi aureola između tri vrste iz roda *Pseudo-nitzschia*. A) *Pseudo-nitzschia deliactissima/cuspidata* complex, B) *P. calliantha*, C) *P. cactiantha*. Preuzeto iz Lundholm i sur. (2003).

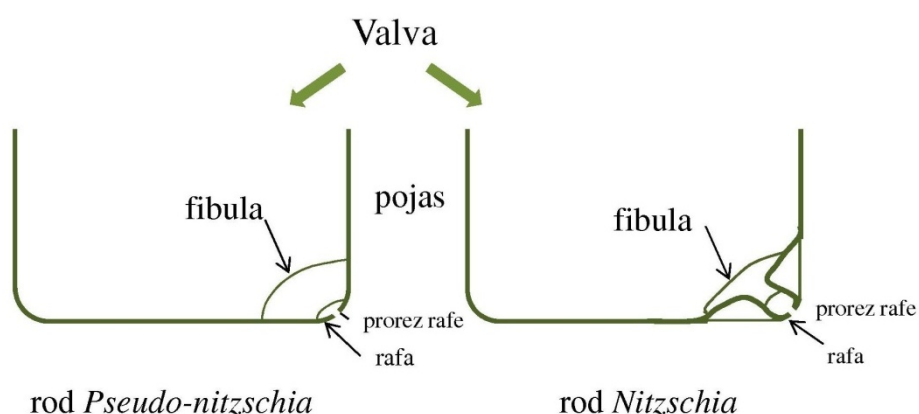
Aureole ili pore važno su morfološko obilježje ovog roda i njihova je struktura bitna za pravilno određivanje vrsta (Slika 1.4). Unutar aureola postoji tanki sloj od silicija specifično perforiran zvan cribrum ili velum. Velum je najtanji i najosjetljiviji dio silicijeve ljušturice kroz koji se odvija izmjena tvari.

Specifične vrste roda *Pseudo-nitzschia* mogu biti određene samo na osnovi detaljnijih morfoloških obilježja, tj. broja strija i fibula, strukture areola, postojanju ili izostanku

središnje pore, obliku, dužini i širini valve. Većinu morfoloških obilježja možemo prepoznati samo elektronskim mikroskopom. Taksonomija ovih dijatomeja temelji se na morfološkim karakteristikama i detaljima silicijeve ljušturice. U posljednje vrijeme molekularne metode dodaju nove definicije morfologiji i taksonomiji, te se koriste kako bi potvrdile postojanje određene vrste ili kako bi se odredile nove vrste (Lundholm i sur., 2002a; Lundholm i sur., 2003).

1.3 TAKSONOMIJA

Rod *Pseudo-nitzschia* opisao je Peragallo M. u Peragallo i Peragallo (1900) iz roda *Nitzschia*, ali rod je prošao kroz mnoge taksonomske promjene u posljednjih stotinu godina na osnovi morfologije kućice (Slika 1.5). Pedeset godina nakon što je opisan, rod *Pseudo-nitzschia*, ponovno je vraćen u rod *Nitzschia* zbog strukture rafe i mobilnosti (Hustedt, 1959). Do 1965. opisano je 18 vrsta i dvije podvrste grupe *Pseudo-nitzschia*: *P. seriata*, *P. seriata* f. *obtusula*¹, *P. pseudoseriata*, *P. pungens*, *P. pungens* f. *multiseries*, *P. fraudulenta*, *P. subfraudulenta*, *P. subpacifica*, *P. heimii*, *P. turgidula*, *P. prolongatoides*, *P. turgiduloides*, *P. lineola*, *P. barkleyi*, *P. inflatula*, *P. cuspidata*, *P. actydropbila*, *P. granii*, *P. subcurvata* i *P. delicatula* (Hasle, 1964; Hasle, 1965).



Slika 1.5. Trans apikalni presjek stanica iz rodova *Pseudo-nitzschia* i *Nitzschia*. Prilagođeno iz Hasle i Syversten (1995).

¹ f= forma

Nitzschia lineola i *N. barkleyi* udružene su u jednu vrstu i nazvane *N. lineola* (Hasle, 1965). Nova vrsta *N. pungiformis* (Hasle, 1971) opisana je 1971. *Nitzschia delicatula* postala je *N. pseudodelicatissima* (Hasle, 1976), a vrsti *N. actydropbila* vraćeno je staro ime *N. delicatissima* (Heiden i Kolbe, 1929; Hasle, 1965).

Konačno je Hasle (1994) ipak izdvojila rod *Pseudo-nitzschia* od roda *Nitzschia* kao zaseban na osnovi morfoloških karakteristika što je kasnije potvrđeno i molekularnim analizama ribosomske DNA 18S (rDNA, Douglas i sur., 1994).

Osnovne značajke roda koje je Hasle definirala prilikom odvajanja roda *Pseudo-nitzschia* spp. su:

- ✓ stanice su slabo silificirane
- ✓ valve su plitke, spljoštene, lagano zakrivljene
- ✓ rafa je smještena bočno, ali nije povišena iznad valve
- ✓ nedostatak pora na zidu kanala rafe
- ✓ prisutnost silicijeve vrpce bez pora na spoju valvalne ravnine i pojasa

Kratko nakon što je *Pseudo-nitzschia* ponovno uvedena kao rod događale su se daljnje promjene u taksonomiji i nazivima vrsta, tako npr. *P. pungens* f. *multiseries* postaje *P. multiseries* (Hasle, 1995). *Nitzschia pseudoseriata* se sada naziva *P. australis*, koristeći staro ime vrste i novo ime roda (Frenguelli, 1938; Hasle, 1965).

Opisane su i mnoge nove vrste: *P. sinica* (Qi i sur., 1994), *P. multistriata* (Takano, 1995), *P. micropora* (Priisholm i sur., 2002), *P. americana*, *P. brasiliiana*, *P. linea* (Lundholm i sur., 2002b) i *P. galaxiae* (Lundholm i Moestrup, 2002). Također su Lundholm i sur. (2003) na osnovi molekularnih metoda podijelili grupu vrsta *P. pseudodelicatissima* u tri zasebne vrste: *P. calliantha*, *P. pseudodelicatissima* i *P. cacialanthe*, a ponovo je definirana *P. cuspidata*. Isti su znanstvenici nastavili istraživati vrstu *P. delicatissima* te je 2006. ponovno opisana i podijeljena u dvije dodatne vrste: *P. dolorosa* i *P. decipiens* (Lundholm i sur., 2006).

Trenutno je poznato oko 37 vrsta unutar roda iako taj broj stalno raste. Točno određivanje moguće je samo elektronskim mikroskopom, a za opis novih vrsta potrebna je i njihova molekularna karakterizacija, te složena filogenija. Samo u prethodnoj godini (2011) popis vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* dodatno se produžio s tri novoopisane vrste.

Lundholm i sur. (2012) su na osnovi molekularnih, morfoloških, reproduktivnih i fizioloških razlika opisali dvije nove kriptične vrste u grupi "*Pseudo-nitzschia delicatissima*". Novo opisane vrste nazvane su *Pseudo-nitzschia hasleana* prema Greti Hasle koja je svojim radom značajno doprinijela taksonomiji i morfologiji ovog roda, a druga opisana vrsta nazvana je *Pseudo-nitzschia fryxelliana* prema Greti Fryxell zbog njenog doprinosa taksonomiji i ekologiji dijatomeja. Treću vrstu opisali su Lim i sur. (2012) i nazvali je *Pseudo-nitzschia circumpora*.

Rod može biti određen svjetlosnim mikroskopom iz strukturalnih karakteristika lančanih kolonija. Dužina i širina stanice također se mogu ugrubo izmjeriti tom metodom. Svjetlosnim mikroskopom rod *Pseudo-nitzschia* može biti podijeljen u dvije podgrupe na osnovi širine stanice: **grupa *seriata*** (širina valve je veća od 3 μm) i **grupa *delicatissima*** (širina valve je manja od 3 μm ; Hasle, 1965; Hasle i Syversten, 1995).

Tradicionalna taksonomija mikrofitoplanktona ovisila je isključivo o mikroskopiji, iako se uvedene nove tehnologije i metode, mikroskopija ima svoja ograničenja i ne omogućava znanstvenicima dovoljan uvid u detalje. Za dijatomeje, takva taksonomija temeljena na mikroskopiji, definirala je vrste na osnovi morfoloških karakteristika i detalja silicijeve kućice (Slika 1.3.), no u posljednje vrijeme molekularne metode dodaju nove definicije taksonomiji i koriste se kako bi potvrdile postojanje određene vrste ili kako bi se odredile nove vrste (Lundholm i Moestrup, 2002; Lundholm i sur., 2002a; Lundholm i sur., 2003; Lundholm i sur., 2006). Od 2002. godine od kada se koriste molekularne metode opisano je 15 novih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*.

1.4 MOLEKULARNA TAKSONOMIJA I FILOGENIJA

Molekularne metode na novi način doprinose saznanjima i istraživanjima o evoluciji i ekologiji unutar prirodnih populacija vrsta roda *Pseudo-nitzschia*.

Tijekom posljednjeg desetljeća, sve veći broj objavljenih radova kombinira klasične morfološke i molekularne metode istraživanja taksonomije i evolucije. Na taj su način opisane nove vrste ili revidirani postojeći opisi vrsta (Lundholm i sur., 2003; Lundholm i sur., 2006; Amato i sur., 2007; Amato i Montresor, 2008; Churro i sur., 2009). Autori navedenih radova dokazali su da se kriptične i pseudo-kriptične vrste pronalaze mnogo češće nego što se ranije očekivalo (Lundholm i sur., 2003; Orsini i sur., 2004;

Lundholm i sur., 2006; Amato i sur., 2007; Quijano-Scheggia i sur., 2009). Kriptične vrste su morfološki identične, ali genetski različite, dok su pseudo-kriptične vrste, osim genetske raznolikosti, pokazale neznatne morfološke razlike koje su otkrivene detaljnim usporedbama (Mann i Evans, 2007). Postojanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta dodatno otežava određivanje vrsta u ovom rodu.

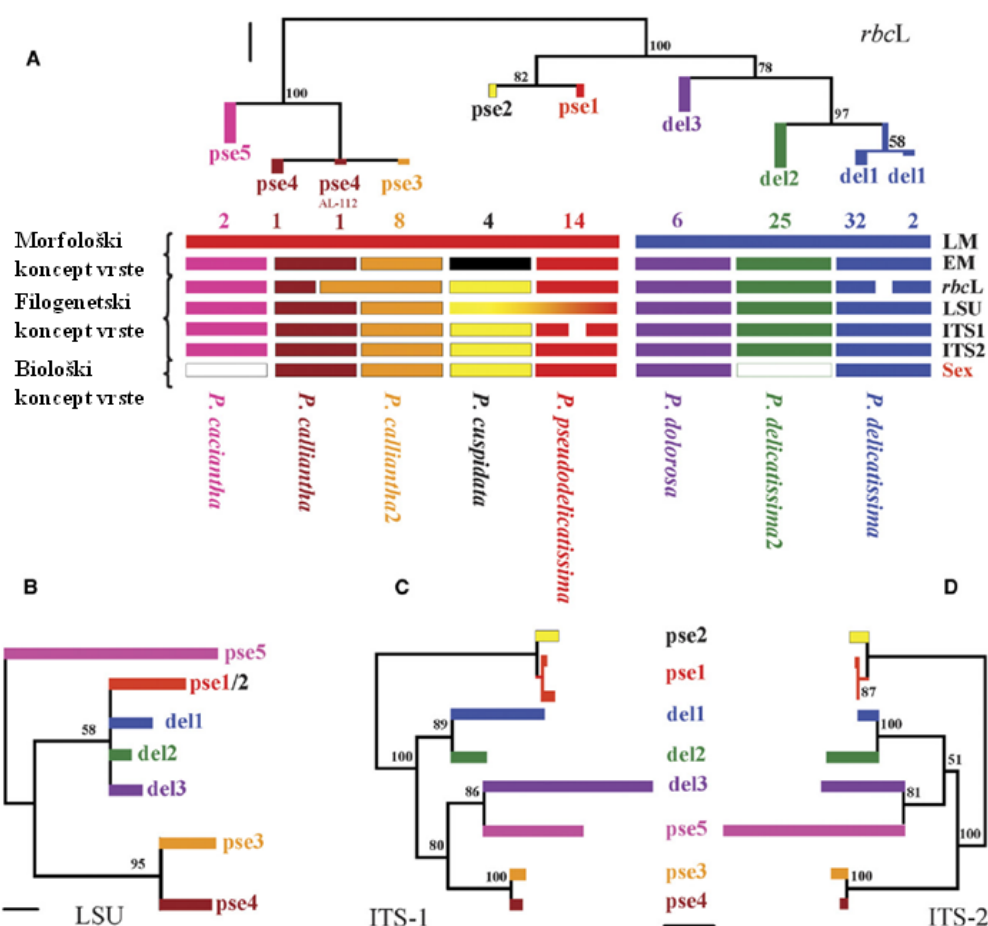
Međutim, točno određivanje vrsta pruža mogućnost lakše razumijevanje složenih fizioloških procesa, proizvodnje toksina, te razumijevanje biogeografije i sukcesije vrsta. Pretpostavlja se da će određivanje do razine vrste pojednostaviti u budućnosti daljnjim razvojem PCR metoda i novim molekularnim metodama kao što su metoda mikrosatelitskim markerima ili ARISA metoda (automatsko određivanje ribosomskih intergenetskih razlika; McDonald i sur., 2007; Hubbard i sur., 2008; Medlin i Kooistra, 2010). Međutim, njihov razvoj i dalje se oslanja na temeljitom razumijevanju osnova taksonomije.

Većina molekularnih metoda koje se primjenjuju za određivanje roda *Pseudo-nitzschia* usredotočena je na ribosomsku DNA. Rezultati sekvencioniranja koriste se za izgradnju filogenetskih stabala i opisivanje razlika među vrstama ili podvrstama (Orsini i sur., 2002; Orsini i sur., 2004; Cerino i sur., 2005). Analiza njihovih rezultata otkriva puno višu razinu raznolikosti unutar prirodnih populacija koja se ne može otkriti samo morfološkim karakteristikama i tradicionalnim mikroskopskim metodama, a može rasvijetliti različite ekotipove i kriptične vrste. Filogenetska istraživanja ovog roda najviše se odnose na različite regije ribosomske DNA: LSU-veliku ribosomsku podjedinicu (Stehr i sur., 2002; Amato i sur., 2007; McDonald i sur., 2007; Thessen i sur., 2009; Moschandreu i sur., 2010), unutarnje transkribirajuće razmaknice regija ITS1 i ITS2 (Lundholm i sur., 2003; Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2006; Amato i sur., 2007; Kaczmarska i sur., 2008; Casteleyn i sur., 2009b; Thessen i sur., 2009; Andree i sur., 2011), mitohondrijsku DNA - citokrom c oksidaza 1 (Kaczmarska i sur., 2008) i na DNA kloroplasta (velika podjedinica *rbcL*, Amato i sur., 2007; Casteleyn i sur., 2009b; Casteleyn i sur., 2010) ili malu podjedinicu (*rbcS*). U većini istraživanja najčešće se koristi regija ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) jer jasno ukazuje genetske razlike među vrstama dok se ITS 2 koristi i kao "barkod" (Evans i sur., 2007; Moniz i Kaczmarska, 2010). U posljednje vrijeme koristi se i sekundarna struktura regije ITS2. Davidovich i Bates (1998) prvi su autori koji su proučavali taksonomsku srodnost i

reproduktivnu kompatibilnost spolnog razmnožavanja kod vrste *P. multiseries*. Mnogi su autori nakon njih koristili isti pristup (Amato i sur., 2007; Casteleyn i sur., 2008; Quijano-Scheggia i sur., 2008a; Lundholm i sur., 2012). Za 14 različitih vrsta *Pseudo-nitzschia* dokazana je reproduktivna kompatibilnost u kulturama (Lelong i sur., 2012). Ovaj je pristup omogućio proizvodnju novih stanica početne veličine korištenih u laboratorijskim eksperimentima kao i potvrdu da sojevi korišteni u reproduktivnim pokusima pripadaju istoj vrsti. Pomoću molekularnih metoda određen je velik broj vrsta i razriješene dvojbe među vrstama unutar ovog roda. Ono što se prije smatralo grupama vrsta *P. pseudodelicatissima* i *P. cuspidata* sada se pokazalo da čine morfološki, molekularno i reproduktivno dobro odvojene cjeline tj. vrste: *P. calliantha*, *P. cacialanthe*, *P. mannii*, *P. hasleana*, *P. fryxelliana* i grupa *P. cuspidata/P. pseudodelicatissima* (Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2007; Amato i Montresor, 2008). Međutim, još uvijek postoji taksonomskih nedoumica s vrstama *P. cuspidata* i *P. pseudodelicatissima*. Jedina morfološka razlika između ove dvije vrste je oblik stanice, te se u svim filogenetskim studijama grupiraju zajedno u istu granu filogenetskog stabla. *Pseudo-nitzschia delicatissima* je podijeljena na pseudo-kriptične vrste: *P. delicatissima*, *P. decipiens* i *P. dolorosa*. Međutim, nedavno je otkriveno da se vrsta *P. delicatissima* u filogenetskim analizama zapravo sastoji od dvije odvojene grane koje čine dvije kriptične vrste *P. delicatissima* i *P. arenysensis* (Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2006; Quijano-Scheggia i sur., 2009). Ove dvije vrste su morfološki potpuno identične, ali usporedbe sekundarne strukture regije ITS2 podupiru pretpostavku da su to odvojene vrste. Osim toga, vrste se razlikuju i obzirom na fiziološke sklonosti, npr. temperaturi mora za spolnog razmnožavanja i razlike u brzini rasta (Kaczmarska i sur., 2008; Quijano-Scheggia i sur., 2009). *Pseudo-nitzschia americana* i pseudo-kriptične vrste *P. brasiliiana* i *P. linea* također predstavljaju morfološku grupu (Lundholm i sur., 2002b). Smatralo se da se vrsta *P. americana* pojavljuje kao epifitska vrsta pojedinačnih stanica, za razliku od drugih vrsta *Pseudo-nitzschia* koje tvore lance, ali Kaczmarska i sur. (2005a) utvrdili su stvaranje lanaca tipičnih za ovaj rod i kod *P. americanae*.

U brojnim su se istraživanjima i eksperimentima koristili navedeni molekularni markeri. Iako molekularne metode imaju značajnih prednosti, nažalost, one imaju i bitnih nedostataka. Stoga, ako uspoređujemo filogenetska stabla napravljena na različitim

genetičkim markerima (ITS1, ITS2, *rbcL*, *rbcS*) obično dobijemo različite filogenetske korelacije među vrstama (Slika 1.6.). Smatra se da će se u budućnosti istraživanja vjerojatno usredotočiti na regiju 18S DNA koja je postojanija i s manje genetskih razlika među vrstama i zasigurno je bolji marker za molekularnu filogeniju od do sada korištenih.

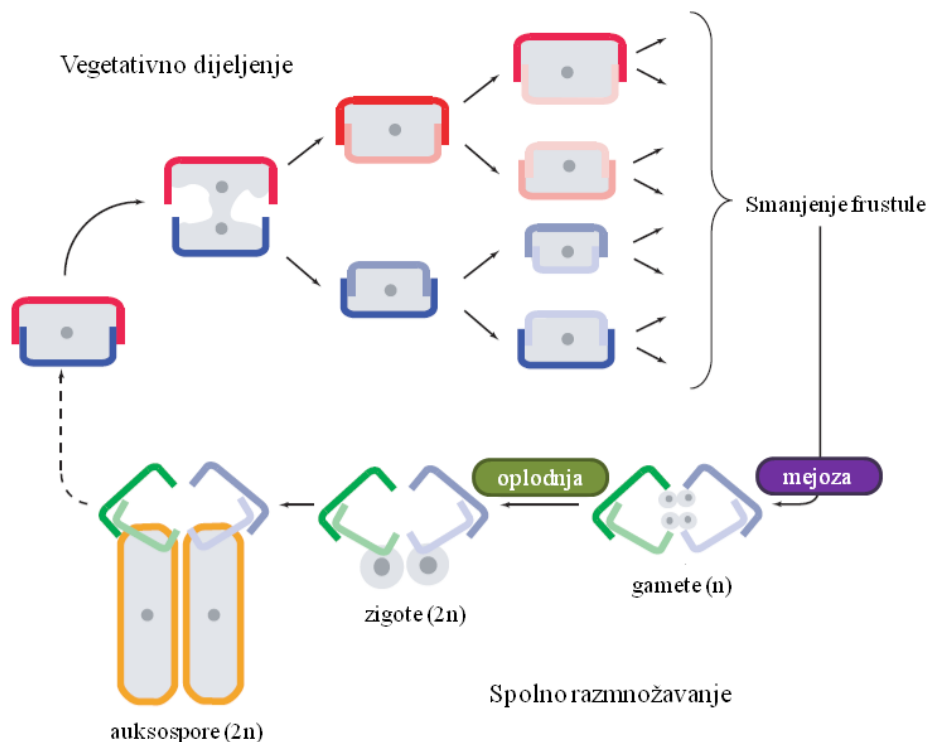


Slika 1.6. Primjer filogenetskih stabala (engl. *maximal likelihood* ML: maksimalna vjerojatnost) nekoliko vrsta *Pseudo-nitzschia*, temeljenog na različitim genetičkim markerima. A) *rbcL*, B) LSU, C) ITS1 i D) ITS2. Preuzeto i prilagođeno iz Amato i sur. (2007).

1.5 ŽIVOTNI CIKLUS

Dijatomeje iz roda *Pseudo-nitzschia* mogu se razmnožavati nespolno i spolno. Nespolno razmnožavanje sastoji se od vegetativnog dijeljenja stanica gdje hipoteka roditeljske stanice postaje epiteka nove stanice, a nova stanica stvara novu hipoteku (Slika 1.7.). Zbog takvog načina razmnožavanja stanice se postupno smanjuju, dok ne dostignu

kritičnu veličinu ispod koje populacija više ne može preživjeti. Tada postaje važno spolno razmnožavanje jer se na taj način populacije vraćaju na početnu veličinu stanica.

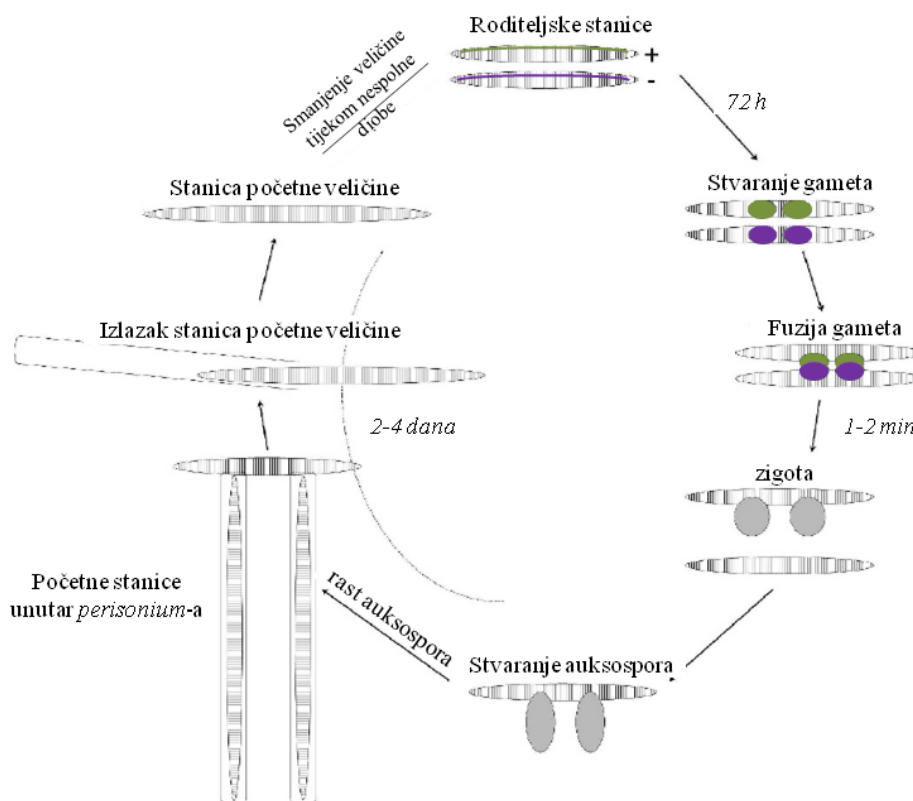


Slika 1.7. Životni ciklus penatne dijatomeje. Prilagođeno iz Casteleyn i sur., 2009a.

Većina *Pseudo-nitzschia* je heterotalična (iznimka je *P. brasiliiana* koja je homotalična) i za spolno razmnožavanje potrebne su stanice suprotnog spola „+“ i „-“, a spolno razmnožavanje naziva se cis-anizogamija (Chepurnov i sur., 2005; D'Alelio i sur., 2010). Nekoliko sati nakon što se pronadu i približe stanice suprotnog spola „+“ i „-“, bez sluzi ili nekog fizičkog kontakta, započinje spolno razmnožavanje (Slika 1.8.). Diploidne se jezgre prije kopulacije redukcijski podijele. Mejozom se stvaraju dvije anizogamete u svakoj roditeljskoj stanici. Gamete su sferične bez bičeva, iako izgledaju identično, različito se ponašaju. Gamete „+“ su lagano pokretne i aktivne dok su gamete „-“ pasivne i nepokretne.

Spajanje gameta (plazmogamija) se događa unutar jedne do dvije minute stvaranjem jedne sferične zigote za svaki par gameta. Zigota se i dalje drži za roditeljsku stanicu i nastavlja se razvijati u auksosporu unutar perizonijuma. Unutar dva do četiri dana

razvije se stanica početne veličine unutar auksospore i izade lomljenjem vrha perizonijuma (Slika 1.8).



Slika 1.8. Spolno razmnožavanje *Pseudo-nitzschia* sp. služi kako bi se vratila početna veličina stanica nakon mnogostrukih vegetativnih dijeljenja. Prilagođeno iz Lelong i sur. (2012).

Većina spoznaja o spolnom razmnožavanju ovog roda dolazi iz laboratorijskih eksperimenata, pretežno se radilo na vrstama *P. multiseriis* i *P. pungens* (Davidovich i Bates, 1998; Chepurnov i sur., 2005). Vrlo je teško uočiti faze spolnog razmnožavanja u prirodnim uzorcima budući da su gamete, zigote i auksospore, vrlo krhke.

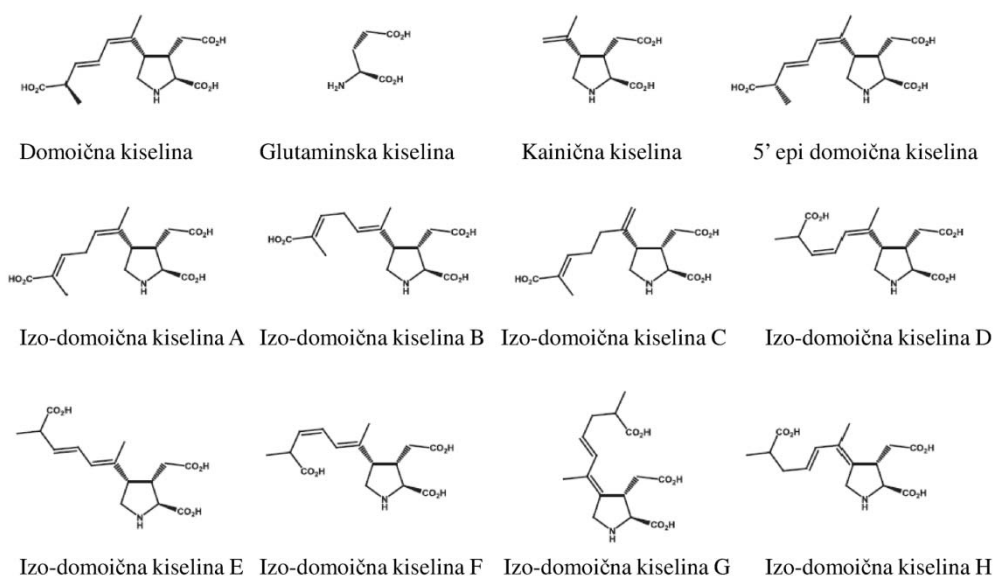
Ipak 2010 godine prvi put su dvije grupe autora (Holtermann i sur., 2010; Sarno i sur., 2010) uočile masovno spolno razmnožavanje roda *Pseudo-nitzschia* u prirodi. Sarno i sur. (2010) vidjeli su masovno spolno razmnožavanje kod vrsta *P. cf. calliantha*² i *P. cf. delicatissima* u Napuljskom zaljevu. Dok su Holtermann i sur. (2010) to uočili kod vrsta *P. australis* i *P. pungens* na obalama države Washington u SAD-u. Obje studije i D'Alelio i sur. (2010) pokazali su da je životni ciklus roda *Pseudo-nitzschia* u

² cf= lat. Confer; slični na

prirodi traje otprilike dvije do tri godine što se poklapa s laboratorijskim istraživanjima. Ono što još nije potpuno jasno je kako se u prirodi sparuju stanice suprotnog spola i što potiče početak spolnog razmnožavanja.

1.6 DOMOIČNA KISELINA

Domoična kiselina (DK) je amino kiselina topiva u vodi (Falk i sur., 1991), sadrži tri karboksilne skupine, te je analog L-glutaminske kiseline. L-glutaminska kiselina je jedan od najvažnijih neuro prenosnika u živčanom sustavu kralježnjaka, a u slučaju unosa DK u organizam ona preuzima ulogu glutaminske kiseline. DK ima nekoliko strukturalnih izomera (izo-domoična kiselina, A-H, Slika 1.9.). Vrste *N. navis-varingica* (Kotaki i sur., 2005; Romero i sur., 2011), *P. australis* (Holland i sur., 2003; Rhodes i sur., 2006) i *P. seriata* (Hansen i sur., 2011) proizvode izomere, a neki izomeri pronađeni su u mesu školjkaša i smatra se da su to proizvodi njihove razgradnje. Epi-DA je rezultat toplinske razgradnje DK (McCarron i sur., 2011; Thomas i sur., 2008).



Slika 1.9. Molekularna struktura domoične kiseline i njenih izomera. Preuzeto iz Lelong i sur., 2012

Biosinteza DK zahtijeva visoku razinu energije u stanici *Pseudo-nitzschiae* (Pan i sur., 1996a) i način njezine sinteze u stanicama još nije u potpunosti rasvijetljen. U stanici se

DK može vezati na receptore za N-metil-D-aspartat u središnjem živčanom sustavu mnogo brže (čak do 100 puta) od glutaminske kiseline (Lelong i sur., 2012). Budući da se DK veže trajno na neurone, za razliku od glutaminske kiseline, njihova depolarizacija je značajno dulja, te dolazi do nakupljanja kalcija u njihovoj neposrednoj blizini. Aktivnost enzima za kalcij ostaje visoka, što dovodi do oticanja neurona, a zatim i njihovog odumiranja.

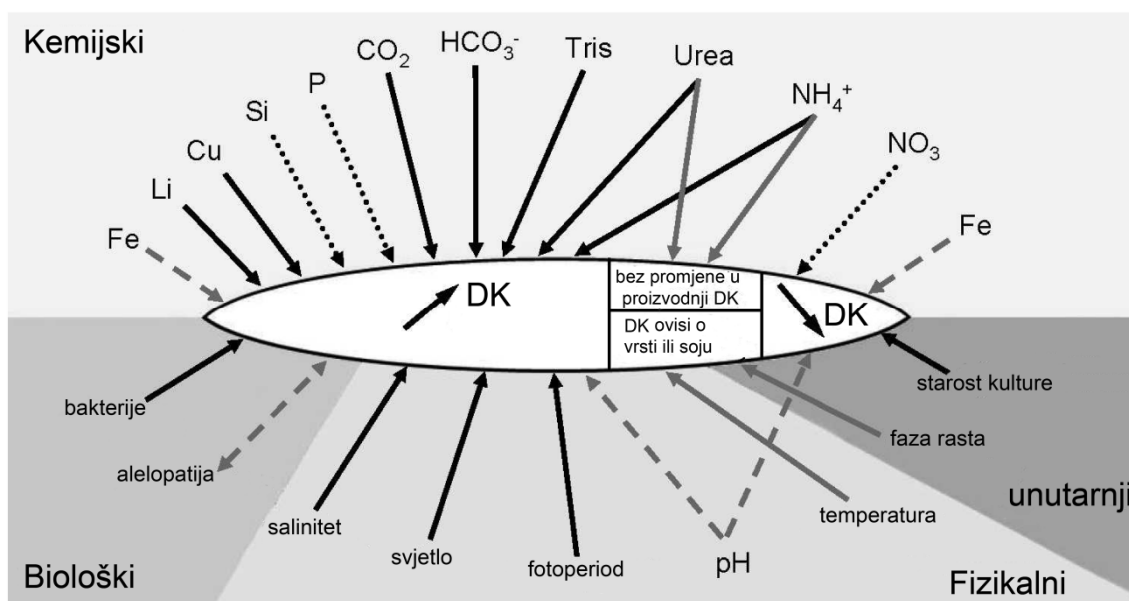
Kod sisavaca (Pulido, 2008) DK djeluje na neurone u hipotalamusu, što dovodi do gubitka pamćenja ili amnezije pa se tako trovanje DK naziva i amnezijsko trovanje školjkašima (ASP). Ostali simptomi trovanja su mučnina, proljev, grčevi, gastroenteritis i smetenost u prvih 24 sata, do neuroloških (glavobolja, otežano disanje, vrtoglavica, gubitak pamćenja), a ponekad i koma 48 sati nakon konzumiranja. Kod starijih ljudi trovanje može završiti smrću. Za sada ne postoji lijek protiv trovanja DK.

1.6.1 FIZIOLOGIJA PROIZVODNJE DOMOIČNE KISELINE

Unatoč raširenom interesu za rod *Pseudo-nitzschia* i proizvodnju DK, naše spoznaje iz fiziologije gotovo su nepromijenjene od najranijih studija na ovim dijatomejama. Ti početni rezultati korišteni su u interpretaciji rezultata velikog broja terenskih istraživanja provedenih u posljednjih deset godina. Rana su istraživanja obično bila na laboratorijskim kulturama vrste *P. multiseriis*, te su uspoređivala stopu rasta i proizvodnju DK (Bates i sur., 1998; Bates i Trainer, 2006), a dobiveni rezultati često su se primjenjivali i na druge vrste. Dokazalo se da je proizvodnja DK u laboratorijskim kultura obično vrlo niska ili nemjerljiva tijekom eksponencijalne i povećava se tijekom stacionarne faze rasta nakon što se usporila dioba stanica, vjerojatno zbog ograničenja hranjivih tvari i promjene u omjeru P:Si. Isto tako, istraživanja su pokazala recipročni odnos između stope rasta i proizvodnje DK u kulturama s ograničenom koncentracijom silicija ili fosfora (Bates i sur., 1996; Kudela i sur., 2004). U kasnijim su istraživanjima uočili da se kod nekih vrsta proizvodnja DK događa u ranoj eksponencijalnoj fazi tijekom brzog rasta, npr. kod vrsta *P. australis* (Garrison i sur., 1992), *P. multiseriis* (Pan i sur., 1996b; Thessen i sur., 2009) i *P. fraudulenta* (Thessen i sur., 2009). Ove studije upućuju na to da ograničenja hranjivih tvari i usporavanje stope rasta i dijeljenja, djeluju na povećanje proizvodnje DK. Slične su rezultate dobili i na terenskim

istraživanjima, koja vjernije opisuju ekologiju ovog roda od laboratorijskih eksperimenata. Iz niza istraživanja utvrđeno je da je limitacija hranjivim solima ili njihovi specifični omjeri često pokretač za proizvodnju DK.

Mnogo se studija bavilo problematikom DK u laboratorijskim uvjetima, a većina autora uspoređivala je proizvodnju DK s varijacijama u koncentraciji metala u tragovima, različitih izvora hranjivih tvari i ostalih bioloških, fizikalnih i kemijskih čimbenika (Slika 1.10.).



Slika 1.10. Čimbenici (biološki, kemijski, fizikalni, unutarnji) koji djeluju na proizvodnju domoične kiseline (DK). Crne strelice označavaju čimbenike koji potiču DK. Crne isprekidane strelice označavaju čimbenike koji smanjuju DK. Sive strelice označavaju čimbenike koji ovise o vrsti ili soju *Pseudo-nitzschia*. Sive isprekidane strelice označavaju čimbenike za koje postoje oprečni podatci u literaturi. Preuređeno iz Lelong i sur. (2012).

Osim već potvrđene limitacije silicijem i fosforom nedavno je otkriveno da niske koncentracije željeza i visoke koncentracije bakra aktiviraju proizvodnju DK i njeno otpuštanje iz stanica budući se smatra da DK ima ulogu u kelaciji metala u tragovima. Kelacija bi učinila niske koncentracije željeza više dostupnima stanicama i zaštitila stanice od previsokih, potencijalno štetnih koncentracija bakra.

Organski izvori dušika (urea i glutamin), kao i promjene u pH, CO₂ i salinitetu također povećavaju proizvodnju DK. Na žalost, iz literature vidimo da laboratorijska i terenska istraživanja ponekad daju oprečne rezultate o uvjetima koji su pogodni ili stimuliraju proizvodnju toksina.

Od bioloških čimbenika istraživale su se različite koncentracije bakterija i alelopatija među vrstama. Dokazano je da veće koncentracije bakterija pozitivno utječu na proizvodnju DK (Lelong i sur., 2012) dok se za alelopatiju još ne zna dovoljno. Iz mnogih reproduktivnih eksperimenata otkriveno je da su sojevi *Pseudo-nitzschia* koji su izgubili mogućnost proizvodnje DK u kulturama nakon spolnog razmnožavanja ponovno mogli sintetizirati DK, te su te koncentracije bile znatno veće.

1.6.2 DOMOIČNA KISELINA U HRANIDBENOM LANCU

Kao dijetomeja *Pseudo-nitzschia* je važan primarni proizvođač kao baza hranidbenog lanca. Služi kao hrana različitim organizmima, od heterotrofnih dinoflagelata do riba i sisavaca koji se hrane planktonom. Domoična kiselina je hidrofilna molekula i ne može se bioakumulirati u tkivima. Umjesto toga, DK se koncentrira u probavnom sustavu kod životinja koje filtriraju vodu s minimalnim prijenosom na okolna tkiva te se u većini slučajeva brzo eliminira iz tijela. Toksin se prenosi na višu kariku hranidbenog lanca kada su primarni potrošači koji u svom probavnom sustavu imaju DK pojedeni od viših potrošača. DK nije toksična za organizme kao što su školjkaši ili ribe. DK se koncentrira u pojedinim organima (probavni sustav), ali se na kraju pročisti iz organizma. Pročišćavanje može trajati od nekoliko sati kod plave dagnje (*M. edulis*) do nekoliko dana kod sredozemne dagnje (*M. galloprovincialis*) i kamenica (*Crassostrea virginica*, Novaczek i sur., 1991; Wohlgeschaffen i sur., 1992; Mackenzie i sur., 1993; Mafra i sur., 2010). Postoje i vrste školjkaša koje se pročišćavaju jako sporo *Siliqua patula* (> 86 dana), *P. magellanicus* (> 14 dana) i *Pecten maximus* (416 dana; Wohlgeschaffen i sur., 1992; Douglas i sur., 1997; Blanco i sur., 2002).

DK se može nakupiti i u organizmima koji se ne hrane filtriranjem vode. DK je pronađena i kod organizama koji se hrane detritusom i žive na dnu (Powell i sur., 2002). Pretpostavlja se da čestice zaostale nakon cvjetanja lagano tonu na dno i tamo se zadržavaju duža vremenska razdoblja i na taj su način organizmi koji žive pri dnu izloženi DK. Čini se da je vertikalni protok u sedimentu znatan izvor toksina za bentoski hranidbeni lanac (Sekula-Wood i sur., 2009; Sekula-Wood i sur., 2011).

U mnogim zemljama širom svijeta uzgajališta školjkaša pod stalnim su monitoringom zbog mogućeg trovanja toksinima iz školjkaša. Nakon cvjetanja toksičnih sojeva vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* DK se koncentrira u školjkašima.

Nakon masovnog trovanja 1987. kanadska vlada odredila je granicu od 20 µg DK po gramu školjkaša (Waldichuk, 1989) nakon koje se uzgajališta školjkaša zatvaraju. Istu su granicu preuzele i zemlje Europske unije (Anonymous, 2002).

Tijekom posljednjeg desetljeća, DK je postala problem i na europskim obalama i za europska uzgajališta. Cvjetanja toksičnih sojeva *Pseudo-nitzschia* posebno su problematična u Velikoj Britaniji, Irskoj i Francuskoj, Danskoj, Portugalu i Španjolskoj (EFSA, 2009). U vodama zapadne Europe utvrđeno je sedam toksičnih vrsta *P. australis*, *P. calliantha*, *P. galaxiae*, *P. multiseriata*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* i *P. seriata* (Sarno i Dahlman, 2000; Cusack i sur., 2002; Orsini i sur., 2002; Moschandreu i sur., 2010).

U prosjeku 59 % ispitivanih školjkaša sadržavalo je veće količine DK od propisanih europskim zakonima (EFSA, 2009). Osobito je u Škotskoj akumulacija DK rezultirala dugoročnim zatvaranjem uzgajališta na zapadnoj obali (Gallacher i sur., 2001; Smith i sur., 2006). Stoga su u Škotskoj 2005. godine promijenili zakon i počeli prodavati samo mišićno tkivo školjakaša (*P. jacobaeus*), u kojima se obično ne zadržava DK i više nema potrebe za zatvaranjem uzgajališta.

Osim amnezijskog trovanja školjkašima kod ljudi zabilježeno je i nekoliko slučajeva trovanja domoičnom kiselinom koja su obuhvaćala ptice i druge morske sisavce (engl. *Domoic Acid Poisoning* - DAP; hr. trovanje domoičnom kiselinom). Prvi slučaj dogodio se 1991. u zaljevu Monterey kada su uginuli smeđi pelikani (*Pelicanus occidentalis*) i kormorani (*Phalacrocorax penicillatus*). U isto je vrijeme u zaljevu cvjetala *P. australis*. A u želudcima uginulih ptica pronađeni su incuni (*Engraulis mordax*). Nakon toga zabilježeni su još mnogi slučajevi trovanja i ugibanja morskih ptica. 1997. uginulo je 766 patki (*Gavia immer*) i 182 morska sisavca (četiri vrste dupina) i za to je trovanje bila odgovorna *P. australis*. Već 1998. 400 morskih lavova (*Zalophus californianus*) otrovano je DK-om u zaljevu Monterey, a pretpostavlja se da su konzumirali otrovane incune (*Engraulis mordax*).

Sva trovanja do sada opisana u literaturi bila su ograničena najviše na tri karike hranidbenog lanca: i) dijatomeja *Pseudo-nitzschia* spp.; ii) filtratorski organizmi ili ribe

koje se hrane planktonom; *iii*) ljudi, morski sisavci ili ptice. Zanimljivo je da su većina slučajeva trovanja DK-om s trofičkim prijenosom na tri karike hranidbenog lanca zabilježena na zapadnim obalama Sjeverne Amerike i Europe (Trainer i sur., 2012).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Oceanografska istraživanja na Jadranu započinju samo dvije godine nakon polaska prve oceanografske ekspedicije u svijetu („Istraživački brod“ Challenger, prosinac 1872.). Najranija istraživanja planktona u Jadranu vezana su za Tršćansku zoološku stanicu (osnovanu 1876.) i Zoološku stanicu Berlinskog akvarija u Rovinju (osnovanu 1891.). Najstariji radovi o fitoplanktonu Jadrana sa samog su početka dvadesetog stoljeća i većinom su taksonomskog tipa. Na Jadranu su radili Schroder (1911.), Shiller (1912., 1913. i 1933.), Jorgensen (1923., 1929.), Kaptner (1941.) i mnogi drugi. Svojim znanstvenim istraživanjima dali su veliki doprinos svjetskoj znanosti i osigurali podatke za proučavanje dugoročnih kolebanja u Jadranskom moru. Osnivanjem Oceanografskog instituta u Splitu započinju istraživanja planktona srednjeg Jadrana. Ercegović (1936) prvi put na Jadranu, a među prvima u Europi uvodi kvantitativna istraživanja fitoplanktona, te se za procjenu abundancije koristi metodom brojanja stanica po Utermohlu (1931). Istraživanja u srednjem Jadranu kasnije nastavlja Pucher-Petković i Homen (Pucher-Petković i Marasović, 1980).

Sjeverni Jadran je najistraženiji dio Jadranskog mora. Gradijenti abundancije, primarne proizvodnje, fitoplanktonske biomase i bioraznolikosti opadaju od zapadne do istočne obale sjevernog Jadrana i pod izravnim su utjecajem voda iz rijeke Po. Kvalitativne analize mikrofitoplanktonske zajednice utvrdile su da su dijatomeje dominantna skupina u sjevernom Jadranu, a prisutne su tijekom cijele godine osim ljeti kada prevladavaju dinoflagelati (Revelante i Gilmartin, 1976b). 70-tih godina prošlog stoljeća kao dominantni rodovi dijatomeja utvrđene su *Nitzschia*, *Chaetoceros*, *Rhizosolenia* i *Thalassiotrix*, od kojih su *Nitzschia* (danas *Pseudo-nitzschia*) i *Chaetoceros* često dominantni (Revelante i Gilmartin, 1976b). U sjevernom Jadranu izmjenjivala su se razdoblja visoke s razdobljima niže proizvodnje sa sklonošću oligotrofikaciji posljednjih godina (Mozetič i sur., 2010). Također je primijećeno značajno smanjenje primarne proizvodnje kao i vrijednosti koncentracije klorofila *a*, posebno u području pod izravnim utjecajem rijeke Po. Pretpostavlja se da su ta smanjenja uvjetovana promjenama u protoku rijeke Po koji se smanjio posljednjih desetak godina (Mozetič i sur., 2010). Promijenio se i ciklus cvjetanja fitoplanktona, ranoproljetno cvjetanje

pomaknulo se mjesec dana kasnije te je nastupila i promjena u taksonomskom sastavu vrsta (Mozetič i sur., 2010), dok je na postaji RV001 proljetno cvjetanje u potpunosti izostalo (Marić i sur., 2012). Tako je posljednjih godina proljetno cvjetanje fitoplanktona u sjevernom Jadranu karakterizirano nanofitoplanktonom i malim kolonijalnim dijatomejama, tj. vrstama koje se mogu bolje prilagoditi na uvjete niskih koncentracija hranjivih soli. Vrste iz roda *Pseudo-nitzschia* imaju veliku mogućnost fiziološke prilagodbe i time potvrđuju svoju sposobnost da dominiraju u različitim okolišnim uvjetima (Bates i sur., 1998). U literaturi nailazimo na oprečne korelacije pa se čini da abiotički čimbenici sami po sebi nisu dovoljni kako bi predvidjeli ekološke uvjete koje dovode do masovnih cvjetanja vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* (Trainer i sur., 2012). Vrste roda *Pseudo-nitzschia* prisutne su u sjevernom Jadranu tijekom čitave godine, a često dostižu visoku abundanciju (10^6 stanica L^{-1}). Obično se javlja nekoliko cvjetanja godišnje za koje se pretpostavlja da su uzorkovana različitim vrstama. Iako je poznato da rod dominira među ostalim planktonskim dijatomejama (Viličić i sur., 2009), još uvijek nije dovoljno istražen i opisan. Identifikacija do razine vrsta je važna zbog njihove potencijalne toksičnosti. Domoična kiselina (DK) u Jadranu zabilježena je 2000. godine prvi put u tkivu školjkaša (vrste *M. galloprovincialis*) uz talijansku obalu (Ciminiello i sur., 2005). Iako je koncentracija DK u analiziranim uzorcima bila niska, autori su preporučili pažljivo praćenje ovog toksina u tkivu školjkaša. DK je od tada zabilježena u nekoliko navrata primjerice, u siječnju 2006. u estuariju rijeke Krke (Ujević i sur., 2010) u koncentraciji $6,55 \mu g g^{-1}$. Tijekom cvjetanja vrste *P. calliantha* u 2007. u sjevernom Jadranu maseni udio DK u prirodnim populacijama školjkaša bio je nizak ($1,32 \mu g g^{-1}$, Marić i sur., 2011). Tijekom posljednjeg desetljeća za istraživanja taksonomije i evolucije sve se više povezuju klasične morfološke i molekularne metode. Na taj način opisane su nove vrste ili revidirani postojeći opisi vrsta (Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2007). Različite regije ribosomske DNA primjenjuju se pri filogenetskim istraživanjima ovog roda. Istraživane su: velika ribosomska podjedinica (engl. *large ribosomal subunit* LSU; Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2007) unutarnje transkribirajuće razmaknice (engl. *internal transcribed spacer* ITS1 i ITS2; Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2007), mitohondrijska DNA (citokrom c oksidaza 1, Kaczmarska i sur., 2008) i DNA kloroplasta (velika podjedinica *rbcL*; Amato i sur., 2007) ili mala podjedinica (*rbcS*; Trainer i sur., 2012). U većini istraživanja ITS je

najčešće korištena regija (ITS1-5.8S-ITS2) jer jasno pokazuje genetske razlike među vrstama (Trainer i sur., 2012). Rezultati se koriste za izradu filogenetskih analiza i opisivanje razlika unutar vrsta ili podvrsta (Amato i sur., 2007).

2.1 CILJEVI I HIPOTEZE

- Određivanje dinamike fitoplanktonske zajednice, višegodišnjih ciklusa, sukcesije vrsta, i promjene abundancije fitoplanktonskih grupa na dvije postaje u sjevernom Jadranu posljednjih 37 godina.
- Određivanje prostorne i vremenske raspodjele dijatomeja roda *Pseudo-nitzschia*, te morfološka, taksonomska i molekularna karakterizacija vrsta prisutnih u sjevernom Jadranu.
- Fizikalno-kemijski uvjeti u morskom okolišu koji pogoduju visokim abundancijama, čime je detaljnije opisana ekologija roda *Pseudo-nitzschia*.
- Identifikacija trendova, te detaljna prostorna i vremenska raspodjela populacija, kao i potencijalno toksične vrste koje se javljaju u sjevernom Jadranu.
- Provjerena je prisutnost domoične kiseline u kulturama sakupljenim u sjevernom Jadranu.
- Molekularna karakterizacija vrsta prisutnih u sjevernom Jadranu i određivanje njihovog geografskog i evolucijskog podrijetla analizama sličnosti, filogenetskim rekonstrukcijama i analizama populacija.

3. MATERIJALI I METODE

3 MATERIJALI I METODE

3.1 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Jadransko more najsjeverniji je dio Sredozemnog. Proteže se od 40° 10' N do 45° 47' N i zauzima površinu od 138 600 km² i volumen 35 000 km³. Jadran je transverzalno i longitudinalno asimetričan, s plitkim sjevernim dijelom, a prema jugu dubine se postupno povećavaju, prema Srednjojadranskoj (Jabučkoj) kotlini (270 m) i Južnojadranskoj kotlini (1200 m). Jadransko more završava Otranskim pragom (780 m), gdje se odvija izmjena vode s Jonskim morem.

Sjeverni Jadran relativno je plitak bazen s prosječnom dubinom oko 35 m. Hidrološke i biološke karakteristike ovog ekosustava pokazuju izrazitu sezonalnu promjenjivost (Degobbis i sur., 2000; Zavatarelli i sur., 2000). Sjeverni Jadran je također specifičan po velikom riječnom dotoku slatke vode, čiji godišnji prosjek iznosi 5700 m³ s⁻¹ (Raicich, 1996), gdje 28 % otpada na samu rijeku Po. Utjecaj slatkovodnog donosa rijeke Po najizraženiji je u proljeće i ljeti kada uzrokuje pad saliniteta, te potiče stratifikaciju vodenog stupca, zagrijavanje i stvaranje termokline na dubini (5-10 m).

Cirkulacija u sjevernom Jadranu je ciklonalna, ulazna struja dolazi uz obalu Istre dok izlazna ide uz talijansku obalu. Ulazna struja naziva se Istočna Jadranska Struja (engl. *Eastern Adriatic Current* - EAC), najjača je u zimi kada je pojačan ulazak vode u Jadran (Zore, 1956; Zore-Armanda, 1969; Artegiani i sur., 1997). Izlazna struja naziva se Zapadna Jadranska Struja (engl. *Westertern Adriatic Current* - WAC) i teče uz zapadnu obalu. U sjevernom Jadranu postoje dva tipa cirkulacije „otvorena“ i „zatvorena“, što znači izmjena voda sa srednjim Jadranom može biti vrlo intenzivna ili ograničena (Franco i Michelato, 1992). Kada je cirkulacija otvorena postoji ulazna struja uz istočnu obalu, EAC, te izlazna struja uz zapadnu obalu WAC. Voda iz rijeke Po ne zadržava se u bazenu. Kod zatvorene cirkulacije voda rijeke Po širi se prema Istarskoj obali i razvija se Istarska Obalna Protustruja (engl. *Istrian Coastal Countercurrent* - ICC; Supić i sur., 2000). Otvorena cirkulacija tipična je za hladniji dio godine dok se u toplijem dijelu godine češće susrećemo sa zatvorenim tipom cirkulacije. Zatvorenom tipu cirkulacije pogoduju snažni vjetrovi (Bura i Jugo), uvjeti izražene stratifikacije vodenog

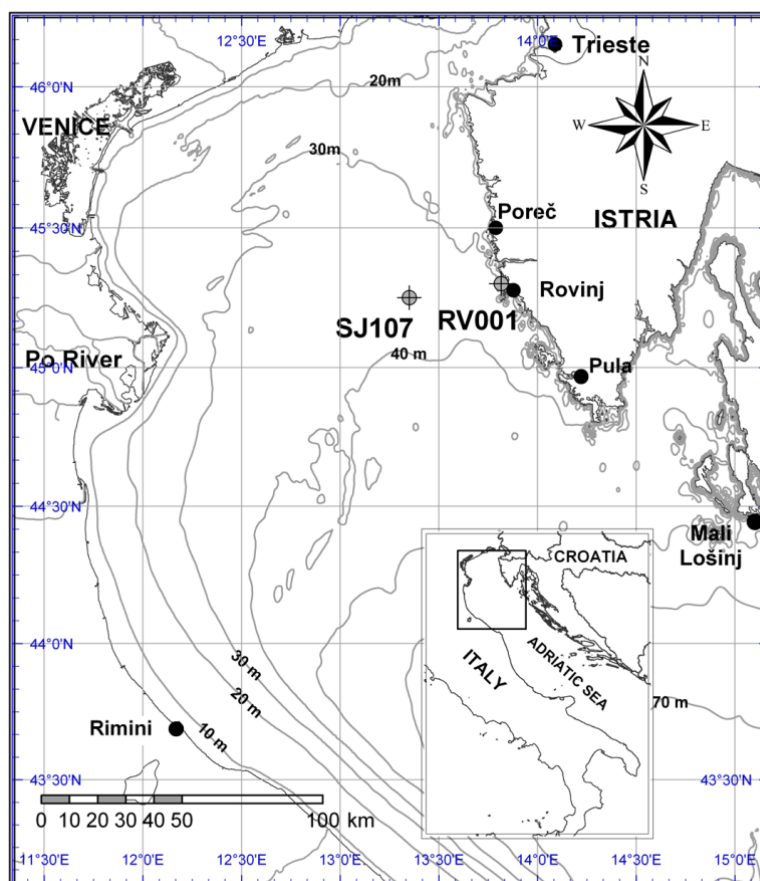
stupca i povećani protok rijeke Po. Slatkovodni donosi rijeke Po tijekom ljeta šire se u površinskom sloju preko čitavog sjevernog Jadrana prema obalama Istre.

U zimskim mjesecima sjeverni Jadran važan je za stvaranje guste vode. To se događa zimi uslijed naglog hlađenja površinskog sloja zbog hladnih vjetrova, uglavnom bure, čime se stvara gusta voda ($t < 11\text{ }^{\circ}\text{C}$, $S \sim 38,4$, $\sigma_t > 29,5$) koja se širi od sjevernog Jadrana prema Jabučkoj kotlini (Zore-Armanda, 1963; Orlić i sur., 1992; Artegiani i sur., 1997).

Za jadransko područje svojstveni su vjetrovi bura i jugo. Bura je katabatičan vjetar koji puše u naletima brzinom i do 50 m s^{-1} , te donosi hladan i suh kontinentalan zrak sa sjeveroistoka. Jačina bure varira uz Jadransku obalu ovisno o konfiguraciji planinskih masiva, te je najjača u Trstu i Senju. Jugo puše s jugoistoka po osi Jadrana, te donosi topao i vlažan zrak. Bura i jugo stvaraju jaku mehaničku silu koja uzrokuje inercijske oscilacije u Jadranu (Orlić, 1987). Jadransko more je umjereno toplo more. Podpovršinska temperatura ne pada ispod $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, a površinska varira od $3\text{--}29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Južni Jadran tijekom zime je za $8\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ topliji od sjevernog Jadrana. Najniže temperature su u veljači, dva mjeseca nakon minimalne insolacije. Termoklina se javlja u toplijem dijelu godine na $10\text{--}30\text{ m}$ dubine, dok u jesen dolazi do izotermije na $18\text{--}19\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gačić i sur., 2001). Salinitet Jadranskog mora je razmjerno visok. Najveći je na južnom Jadranu ($38,4\text{--}38,9$), dok je na sjevernom Jadranu, kao i na obalnom dijelu niži, te dosta varijabilan (Gačić i sur., 2001).

3.2 PRIKUPLJANJE UZORAKA

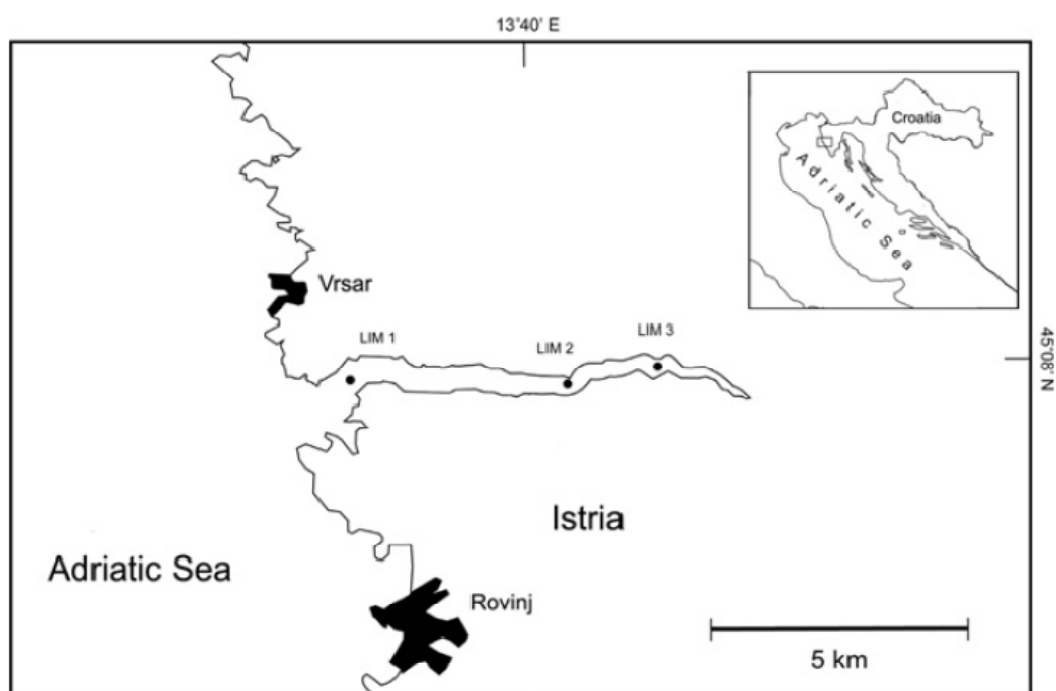
Dugoročna istraživanja fitoplanktona provedena su na dvije istraživačke postaje u sjevernom Jadranu RV001 (1nm) i SJ107 (13 nm) od obale (Slika 3.1). Uzorkovanje je provedeno uglavnom mjesečno od 1972. do 2009 godine. Osim od 1974-1976., 1979. i 1985-1987. kada je uzorkovanje bilo sporadično ili sezonski na obje istraživane postaje (detaljne tablice uzorkovanja dane su u prilogima 1. i 2.). Morska voda za određivanje koncentracije klorofila *a*, fitoplanktona i hranjivih soli uzorkovana je Van Dornovim, a kasnije Niskinovim crpcima zapremnine 5 litara na dubinama od 0, 5, 10, 20, 30 m (gdje je to moguće) i dva metra od dna.



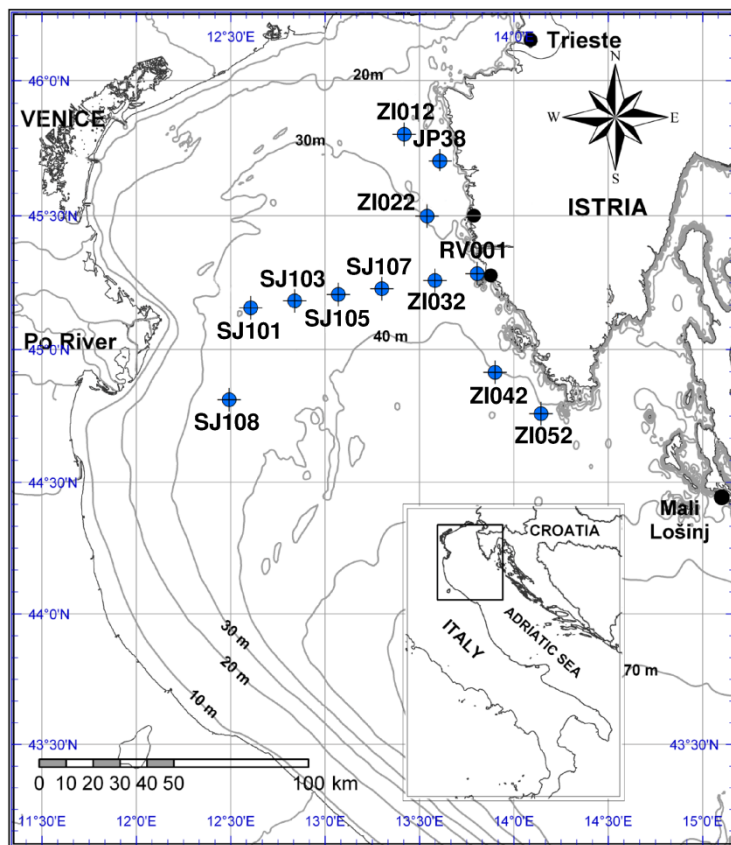
Slika 3.1. Karta područja na kojima su provedena dugoročna istraživanja.

Skup podataka sastoji se od 2 422 uzoraka, sakupljenih na dvije postaje tijekom 37 godina (931 na postaji RV001, 1491 na SJ107). Broj uzoraka je prilično ujednačeno raspodijeljen po sezonama, osim što je zimska sezona, zbog prevladavajućih lošijih vremenskih uvjeta malo manje zastupljena.

U Limskom kanalu uzorkovalo se mjesečno od ožujka 2002. do lipnja 2008. godine na tri istraživačke postaje prikazane na slici 3.2. Limski kanal proteže se na 11 km dužine s širinom od 0,5 km, a najveća dubina je na ulazu u zaljev iznosi 33 m (postaja Lim 1), a na postaji Lim 3, 17 m. Prikupljeno i obrađeno je 453 uzorka fitoplanktona kroz istraživano razdoblje. Na postajama Lim 1 i Lim 2 morska voda za određivanje koncentracije klorofila *a*, fitoplanktona i hranjivih soli uzorkovana je Niskinovim crpcima zapremnine 5 litara na dubinama od 0, 5, 10, 20, i dva metra od dna. A na postaji Lim 3 na četiri dubine.



Slika 3.2. Postaje u Limskom kanalu na kojima su određivane vrste iz roda *Pseudo-nitzschia* i kasnije su se uzimali živi uzorci za kulture i filogenetska istraživanja.



Slika 3.3. Karta istraživanog područja tokom 2007. za određivanje ekologije i dinamike *Pseudo-nitzschia calliantha*.

Za određivanje ekologije, dinamike i potencijalne toksičnosti dijatomeja iz roda *Pseudo-nitzschia* tijekom 2007. godine dodatno se uzorkovalo na 12 istraživačkih postaja u sjevernom Jadranu jednom mjesečno (Slika 3.3). Morska voda za određivanje koncentracije klorofila *a*, fitoplanktona i hranjivih soli uzorkovana je Niskinovim crpcima zapremnine 5 litara na dubinama od 0, 5, 10, 20, 30 m (gdje je to moguće) i dva metra od dna. Ukupno je obrađen 541 uzorak fitoplanktona.

3.3 MJERENJE TEMPERATURE I SALINITETA

Temperatura mora mjerena je obrtnim termometrima tvrtke Richter und Wiese (Berlin, Njemačka, preciznosti $\pm 0,1$ °C) pričvršćenim na crpce. Crpci su držani na određenoj dubini najmanje 5 minuta. Preciznost očitavanja temperature iznosi $\pm 0,02$ °C.

Salinitet morske vode određivan je titracijom sa srebrnim nitratom (do 1976. godine) ili laboratorijskim salinometrom visoke preciznosti Beckman RS-7C, odnosno YEO-KAL 601Mk1V kasnije. Kao standard koristila se Kopenhagška voda saliniteta 35,0000. Salinometrom se određuje vrijednost omjera vodljivosti uzorka i kopenhagške vode. Iz ove se vrijednosti pomoću empirijskih formula računa salinitet (UNESCO, 1986). Preciznost određivanja saliniteta titracijom iznosi $\pm 0,02$, a salinometrom $\pm 0,005$. Temperatura i salinitet mjereni su i multiparametričkom CTD sondom (SBE 25, Sea Bird Electronics Inc., Bellevue, Washington, SAD).

3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KLOROFILA *A*

Uzorci morske vode za određivanje klorofila *a*, volumena 0,5 L, profiltrirani su preko filtra sa staklenim vlaknima veličine pora 1,2 μm (Whatman GF/C). Do određivanja, filteri su pohranjeni u hladnjaku na -22 °C. Fluorimetrijska metoda za određivanje koncentracije klorofila *a* u uzorcima morske vode temelji se na mjerenju fluorescencije 90 % acetonskog ekstrakta pigmenata prije i poslije zakiseljavanja HCl-om. Na taj je način mjerena fotosintetski aktivna frakcija (klorofil *a*) i neaktivna frakcija (feopigmenti) pigmenata prisutnih u uzorku prema metodama predloženim u Strickland i Parsons (1972).

3.5 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HRANJIVIH SOLI

Koncentracija hranjivih soli (nitrati, nitriti, amonij, ortofosfati i ortosilikati) određivala se uobičajenim spektrofotometrijskim metodama korištenjem Shimadzu UV-Mini 1240 spektrofotometra prema metodama opisanim u Strickland i Parsons, 1972.

3.6 ODREĐIVANJE ABUNDANCIJE I TAKSONOMSKOG SASTAVA FITOPLANKTONA

Uzorci od 200 mL za analizu abundancije fitoplanktona fiksirani su u 2 %-tnoj otopini neutraliziranog formaldehida ili otopini neutralnog lugola. Nakon toga poduzorci od 50 mL sedimentiraju se 24 sata u komoricama za sedimentaciju. Abundancija stanica određila se brojanjem stanica inverznim mikroskopom Zeiss Axiovert 200 metodom prema Utermöhl (1958). Stanice se broje u vidnim poljima i transektima. Prvo se broje stanice veličine 2-20 µm u pola transekta na povećanju od 400×. Na taj se način broje kokolitoforidi, male pojedinačne stanice dijatomeja (npr. stanice roda *Chaetoceros*), mali dinoflagelati i nanoflagelati. Brojne nanofitoplanktonske stanice broje se u nasumce odabranim vidnim poljima na povećanju od 400×. Zatim se pregledavaju transekti na povećanju 200× i pomoću faznog kontrasta gdje se broje stanice mikropilanktona. Nakon toga se na povećanju 100× pregledaju obje polovice dna komorice i na taj se način broje velike stanice male abundancije. Vrste mikrofitaoplanktona koje se pojavljuju u velikom broju mogu se izbrojiti i metodom nasumce odabranih probnih polja pod povećanjem 200×. Točnost brojanja ovom metodom iznosi ±10 %. Tako dobivene vrijednosti preračunavaju se u broj stanica po litri morske vode s različitim faktorima konverzije.

Određivanje faktora (F) za određeno povećanje, provodi se tako da se površina dna komorice podjeli s površinom transekta.

$$F = R^2 \times \pi / r^2 \times \pi \quad (1)$$

R – polumjer komorice za brojanje

r – polumjer vidnog polja (za određeno povećanje)

Broj stanica u transektu (n) pomnoži se faktorom F, što daje broj stanica u analiziranom volumenu poduzorka (N1).

$$N1 = n F$$

Ukupan broj stanica (N1) u volumenu poduzorka (V1) preračuna se u ukupan broj stanica po litri (N). V = 1L

$$N1 : V1 = N : V$$

$$N = N1 V / V1$$

Broj stanica po litri iz vrijednosti dobivenih u nasumce odabranim vidnim poljima računa se na slijedeći način.

F – faktor

P – površina dna komorice za brojanje

p – površina vidnog polja (za određeno povećanje)

$$F = P / p$$

Zatim se izračuna prosječan broj stanica u vidnom polju (N2).

Σn – zbroj stanica u svim vidnim poljima

q – broj vidnih polja

$$N2 = \Sigma n / q$$

Taj se broj preračuna u broj stanica u analiziranom poduzorku.

$$N1 = N2 F$$

Iz te vrijednosti izračuna se broj stanica po litri po jednadžbi (1).

Za taksonomsku analizu korišteni su ključevi i priručnici za determinaciju fitoplanktona (Hustedt, 1930; Schiller, 1933; Sournia, 1986; Round i sur., 1990; Throndsen, 1993; Hasle i Syversten, 1995; Bérard-Therriault i sur., 1999; Horner, 2002).

3.7 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Za detaljna morfološka i taksonomska istraživanja osim svjetlosne mikroskopije koristila se i elektronska mikroskopija (pretražna elektronska mikroskopija – SEM i transmisijaska elektronska mikroskopija – TEM) na prirodnim uzorcima i sakupljenim kulturama. Mrežni uzorci fitoplanktona ili kultura stanica očišćeni su od organske tvari i pripremljeni su za detaljnu taksonomsku analizu na elektronskim mikroskopima – pretražnom (Philips 515) i transmisijskim FEI Morgagni 268D, FEI tecnai TEM (FEI, Eindhoven, Nizozemska).

Proces čišćenja ljušturica dijatomeja sastoji se od ispiranja uzoraka od formalina, te uklanjanja organske tvari oksidacijom kiselinama (dušična ili sumporna kiselina). Uzorci su ostavljeni u 50 % dušičnoj kiselini 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga su isprani u destiliranoj vodi. Jedna kap očišćenog materijala nakapana je na bakrenu mrežicu koja je prekrivena piloformnom folijom (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK),

osušena na zraku i promatrana transmisijским mikroskopom FEI TECNAI TEM (FEI, Eindhoven, Nizozemska). Za analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu uzorci su nakapani na aluminijske držače upareni zlatom na S150A Sputter coater Edwards, Crawley, UK i promatrani na SEM mikroskopu, Philips 515 SEM (FEI, Eindhoven, Nizozemska).

Morfološka mjerenja i usporedba s mjerenjima iz literature obavila su se prema metodama predloženim u Lundholm i sur. (2003).

3.8 IZOLACIJA KULTURA

U zadnje tri godine dodatno su se uzimali živi mrežni uzorci fitoplanktona na postajama Po profila u sjevernom Jadranu. Nakon dolaska u laboratorij mikropipetom izolirane su pojedinačne stanice ili lančane kolonije kako bi se dobile monoklonalne kulture vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Kulture su se uzgajale na f/2 mediju (Guillard, 1975).

F/2 medij priprema se iz filtriranog i autoklaviranog mora dodavanjem otopina hranjivih soli, metala u tragovima, kelata i vitamina. Kulture stanica fitoplanktona rasle su u bočicama od 50-250 mL (Starsted) u inkubatoru (Memert ICP 600) pri svjetlosti od $75 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-2}$, s razdobljem svjetla i tame 12:12. Kulture su presađivane svakih tri do četiri tjedna.

Na autohtonim sojevima vrsta *Pseudo-nitzschia* iz sjevernog Jadrana u kontroliranim laboratorijskim uvjetima određene su njihove morfološke (taksonomske), fiziološke, ekološke i molekularne karakteristike, te se istraživala njihova potencijalna toksičnost.

3.9 MOLEKULARNE METODE

Molekularnim metodama, nakon izdvajanja genomske DNA, lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) umnožili su se određeni odsjecci genoma (18S rDNA, ITS1-5,8S-ITS2, 28S rDNA) prema početnicama navedenim u literaturi (Lundholm i sur., 2003, Amato i sur., 2007 i dr.), te se obavilo sekvenciranje i provela se detaljna filogenetska istraživanja, te usporedba sojeva iz sjevernog Jadrana s

dostupnim sekvencama iz Sredozemnog mora i ostalih dijelova svijeta u međunarodnoj bazi podataka NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.9.1 IZDVAJANJE GENOMSKE DNA

Kulture su profiltrirane na filter od 3 μm ili centrifugirane za izoliranje DNA. Za izolaciju genomske DNA iz kultura stanica korišten je Qiagen plant tissue kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema preporukama proizvođača.

3.9.2 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM - PCR

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) metoda je umnažanja određenih odsječaka DNA u uvjetima *in vitro*. Reakcija se odvija u strogo kontroliranim uvjetima (temperatura i trajanje). Reakcijska smjesa i PCR protokol prilagođeni su i optimizirani odsječcima DNA (18SrDNA, ITS1-5,8S-ITS2, 28SrDNA) koji smo željeli kopirati (Tablice 3.1. i 3.2.).

Tablica 3.1. Reakcijska smjesa reagensa za PCR

Reagensi V/ μL	18S	ITS	28S
dH_2O	5,15	5,65	8,8
10x Pufer za PCR sadrži MgCl_2	2,5	2,5	2,5
Q-otopina	5	5	5
Početnica Forward (20pm/ μL)	1	1	0,25
Početnica Reverse (20pm/ μL)	1	1	0,25
MgCl_2	2	2	2,5
BSA	0,5	0,5	-
dNTPs (1.25 mM)	2,5	2	0,5
DNA kalup (~20ng/ μL)	5	5	5
<i>Taq</i> DNA polimeraza (5 U/ μL)	0,35	0,35	0,2
Ukupni volumen	25 μL	25 μL	25 μL

PCR reakcija započela je početnom denaturacijom pri temperaturi 94 °C u trajanju dvije minute. Zatim 30 ciklusa s denaturacijom pri temperaturi 94 °C/45s, sparivanje početnica 52 °C/45s, produljivanje lanca DNA 72 °C/60s i završno produljivanje lanca

DNA pri 72 °C/1-3 minute. Uslijedilo je hlađenje PCR produkta. Specifičnost i količina PCR produkta provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu. Hipervarijabilno područje gena za 18S rDNA multiplicirano je korištenjem početnica D512 i D978rev (Tablica 3.3) prema protokolu kojeg su opisali Zimmermann i sur. (2011).

Tablica 3.2. Uvjeti PCR reakcije.

Nr.	Uvjeti reakcije	18S		ITS1- 5,8S -ITS2		28S (D1-D3)	
		<i>t</i> /°C	v/min	<i>t</i> /°C	v/min	<i>t</i> /°C	v/min
1	Početna denaturacija	94	2	94	3,5	94	3
2	Denaturacija	94	45s	94	50s	94	50s
3	Sparivanje početnica	52	45s	50	50s	50	50s
4	Produljivanje lanca	72	90s	72	80s	72	2
5	Završno produljivanje DNA	72	30	72	30	72	10
6	Hlađenje	4	0	4	0	4	0

Tablica 3.3. Početnice korištene u PCR reakcijama za različite multiplicirane regije.

Regija DNA	Naziv početnice	početnica
18S	D512for 18 S D978rev 18S	5-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3 5-GACTACGATGGTATCTAATC-3
ITS1-5,8S-ITS2	ITSL Diat-ITS-NL38-R	5-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3 5-CGCTTAATTATATGCTTA-3
28S (D1-D3)	D1R D3Ca	5-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3 5-ACGAACGATTGTCACGTCAG-3

Amplifikacija regija ITS1-5,8S-ITS2 provedena je prema protokolu opisanom u Tablici 3.2., a korištene su početnice ITSL i Diat-ITS-NL38-R date u Tablici 3.3. Amplifikacija regije 28S (D1-D3) provedena je prema protokolima opisanim u Tablicama 3.1 i 3.2., a korištene su početnice D1R i D3Ca (Tablica 3.3).

PCR produkt pročišćen je korištenjem Quiagen seta za purifikaciju (Quiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača, te pripremljen za sekvencioniranje. 10-20 ng PCR produkta poslano je na komercijalno sekvencioniranje (Macrogen, Nizozemska).

3.9.3 ANALIZA SEKVENCI

Sekvence za svaki smjer su uspoređene da bi se ispravile moguće pogreške prilikom sekvencioniranja prema pravilu većine (3:1). Dobivene sekvence za 18S sravnjene (posložene) su ručno na temelju javno dostupnih sekvenci uključujući više od 1200 sekvenci dijatomeja dostupnih u NCBI-u (SSURef_98_Silva_20_03_09_opt database; (Pruesse i sur., 2007). Dobivene sekvence za 28S sravnjene (posložene) su ručno na temelju javno dostupnih sekvenca uključujući više od 1500 sekvenci dijatomeja dostupnih u NCBI-u (LSUParc_111_SILVA_05_08_12_opt; Pruesse i sur., 2007). Za regiju ITS sekvence su uspoređene i posložene prema javno dostupnim sekvencama u NCBI-u prema 602 dostupnih sekvenci.

Sekvence su uspoređene koristeći ARB 5.5 softverski paket (Ludwig i sur., 2004). S ciljem određivanja sličnosti u primarnoj strukturi sekvenci (redoslijedu nukleotida), a time i njihove taksonomske pripadnosti (Kumar i sur., 2006; Peplies i sur., 2008). Dobivene sekvence uspoređene su s javno dostupnim sekvencama pohranjenim u „Gen Bank“ i NCBI-u (Benson i sur., 2011). Analiza podataka koji pokazuju sličnost među sekvencama provedena je koristeći algoritam najbližih susjeda (engl. *neighbour-joining*, NJ; Felsenstein, 1981; 1985; 1989; 1993). Rezultati su prikazani pomoću stabala sličnosti i matrica različitosti. Za filogeniju korišten je ARB 5.5 softverski paket (Ludwig i sur., 2004) i modul RAXML za najizgledniju filogenetsku rekonstrukciju (engl. *Maximum likelihood analysis*). Prikazane su bootstrap vrijednosti nakon 1000 iteracija. Stabla su strogi konsenzus 100 najboljih stabala.

3.9.4 STATISTIČKA ANALIZA PARSIMONIJE - SAP

Statistička analiza parsimonije (engl. *Statistical parsimony analysis* - SPA) procijenjena je iz sekvenci kao što je opisano u Templeton i sur. (1992) koristeći software TCS verzija 1.21 (Clement i sur., 2000). Statističke mreže parsimonije izračunate su s graničnom vrijednosti vjerojatnosti od 95 %.

3.10 ODREĐIVANJE DOMOIČNE KISELINE U KULTURAMA

Određivanje domoične kiseline provedeno je u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša u Institutu za Oceanografiju i ribarstvo u Splitu pod vodstvom dr. sc. Ivane Ujević. Kvalitativno i kvantitativno određivanje toksina, DK i epi-DK provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography* - HPLC) prema protokolu kojeg su predložili Quillam i suradnici (1995).

Za određivanje DK u kulturama *Pseudo-nitzschia* korištena je modificirana metodologija opisana u Ujević i sur. 2010. Profiltrirano je od 50-100 ml kultura (ovisno o gustoći) na staklene filtere pora 0,22 µm. Filteri su pohranjeni u 50 % vodenoj otopini MeOH (Kemika) i spremljeni na -20 °C do analize na HPLC-u. Prije analize u svaki uzorak dodano je još 10 ml 50% vodene otopine MeOH, zatim su filteri homogenizirani ultrazvučnom sondom tijekom 1 minute. Nakon toga uslijedilo je centrifugiranje na 4500 o/min u trajanju od 20 minuta, te je supernatant filtriran kroz membranski filter promjera pora 0,45 µm (PTFE, Whatman). Zbog uklanjanja moguće interferencije (vrijeme zadržavanja) DK s triptofanom prije injektiranja uzorka u instrument, obavljeno je pročišćavanje ekstrakcijom na krutoj fazi. Volumen od 5mL filtriranog supernatanta propušten je preko kolonica za pročišćavanje, punjenih s anionskim izmjenjivačem. Budući se DK može raspasti pri smrzavanju mjerenja su obavljena odmah nakon pripreme ekstrakta. U instrument je injektirano 50 µL uzorka. Za analizu je korišten HPLC sustav sačinjen od pumpe Varian ProSTAR 230, ultraljubičastog detektora 310 (UV/Vis), detektora s nizom dioda 335 (DAD) i 410 autosamplera. Kalibracijska krivulja dobivena je korištenjem mjerenja standardnih kalibracijskih otopina za domoičnu kiselinu (National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada) različitih koncentracija (0,25; 1,0; 2,5; i 10,0 µg mL⁻¹).

Korištena je kolona Pinnacle II C18, 250×4,6mm (Restek), s pretkolonom C18 (20 × 4 mm) pri temperaturi od 40 °C. UV detektorom mjerena je apsorpcija DK i epi-DK pri valnoj duljini 242 nm, što je njihov apsorpcijski maksimum. DAD detektorom mjerena je apsorpcijski spektar u rasponu od 200 do 400 nm. Mobilnu fazu sačinjava 100 ml C₂H₃N, 0,2 ml C₂HF₃O₂ i do 1000 mL deionizirane vode. Brzina protoka mobilne faze bila je 1 mL min⁻¹ te je pri navedenim uvjetima vrijeme zadržavanja DK

bilo 12,8 minuta. Ukupno je obrađeno 20 uzoraka kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana.

3.11 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U analizi podataka koristili su se statistički paketi Primer, Systat, i Statistica.

3.11.1 KUMULATIVNA ANALIZA SALINITETA

Kumulativni zbroj saliniteta napravljen je s ciljem otkrivanja značajnih promjena u ekosustavu. Korištena je metoda kumulativne funkcije (Ibanez i sur., 1993). Ova metoda sastoji se od zbrajanja razlike (standardne devijacije), tj. odstupanja od referentne (prosječne) vrijednosti, u ovom slučaju, odstupanja od dugoročnih prosjeka saliniteta. Kao referentna vrijednost korištene su prosječne mjesečne vrijednosti saliniteta na godišnjoj skali, te je iz njih izgrađen graf kumulativnog zbroja saliniteta. Tumačenje općeg trenda serije podataka temelji se na nagibu linije na kumulativnom prikazu, te pad ili rast linije ukazuju na stalna odstupanja od referentne (prosječne) vrijednosti. Kontinuirani pad ili rast kumulativne linije označavaju sustavno više ili niže vrijednosti od prosjeka. Nagib linije u kumulativnom prikazu ukazuje na jačinu nastalih odstupanja.

3.11.2 ANALIZA PRIJELOMNIH RAZDOBLJA

Za analizu prijelomnih razdoblja (engl. *Regime shift* - RS) korištena je parametrijska metoda koja se temelji na sekvencijalnom *t*-testu koji testira eventualna prijelomna razdoblja u softwaru STARS, kojeg je razvio Rodionov (2004), a doradili su ga Rodionov i Overland (2005). Softver otkriva statistički značajne pomake srednje vrijednosti podataka, te jačinu promjene u vremenskim nizovima. Pomak nastaje kada postoji značajna razlika između srednje vrijednosti varijable prije i nakon određene točke u vremenu. Analiza je definirana određivanjem razdoblja (engl. *cut-off point*) u kojima se dogodila eventualna promjena i što je duže zadano razdoblje signal je jači. Da bi testirali i odredili prijelomna razdoblja koristili smo razdoblje od 10 godina (*cut-off length*), s vjerojatnošću od 0,02 na svim grupama fitoplanktona.

3.11.3 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

Metoda analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis* - PCA) korištena je za korelacije okolišnih komponenti i abundancija grupa fitoplanktona. Ova metoda pogodna je za ordinaciju na osnovi okolišnih varijabli koje su obično izražene u različitim jedinicama i skalama i ne sadrže velike blokove podataka čija je vrijednost jednaka nuli (Clarke i Warwick, 2001). Prije PCA analize vrijednosti ekoloških čimbenika transformirane su četvrtim korijenom i normalizirane.

3.11.4 KORELACIJE I INDEKSI DIVERZITETA

Koeficijenti korelacije izražavaju mjeru povezanosti između dvije varijable u jedinicama neovisnima o konkretnim jedinicama mjere u kojima su iskazane vrijednosti varijabli. Postoji više koeficijenata korelacije koji se koriste u različitim slučajevima. U praksi se prilikom rada s linearnim modelima najčešće koristi Pearsonov koeficijent korelacije. Prilikom rada s modelima koji nisu linearni najčešće se koristi Spearmanov koeficijent korelacije. Za izračunavanje Spearmanovog koeficijenta korelacije korišten je software Statistica 6.0.

Struktura zajednice fitoplanktona opisana je ukupnim brojem vrsta (S) i Margalef indeksom (d) koji predstavlja bogatstvo vrsta kao funkciju ukupnog broja jedinki (N) i ukupnog broja vrsta (S):

$$d = \frac{S-1}{\log(N)}$$

Za određivanje raznolikosti fitoplanktonske zajednice korišten je Shannon-Wienerov indeks izračunat po formuli (Krebs, 1999):

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

koristi se za određivanje raznolikosti fitoplanktonske zajednice. Za grafičku prezentaciju podataka koristili su se programski paketi Grapher 8.0 i Ocean data viewer (ODV).

4. REZULTATI

4 REZULTATI

4.1 RASPODJELA PO GODINAMA

Tijekom istraživanih razdoblja uzorkovanje nije bilo ravnomjerno. U prvim godinama istraživanja izmjenjivala su se razdoblja sa čestim uzorkovanjem i ona bez. Učestalost uzorkovanja postaje veća i stalnija nakon 1988. godine, a tablice s detaljnim uzorkovanjem nalaze se u prilogima 1 i 2.

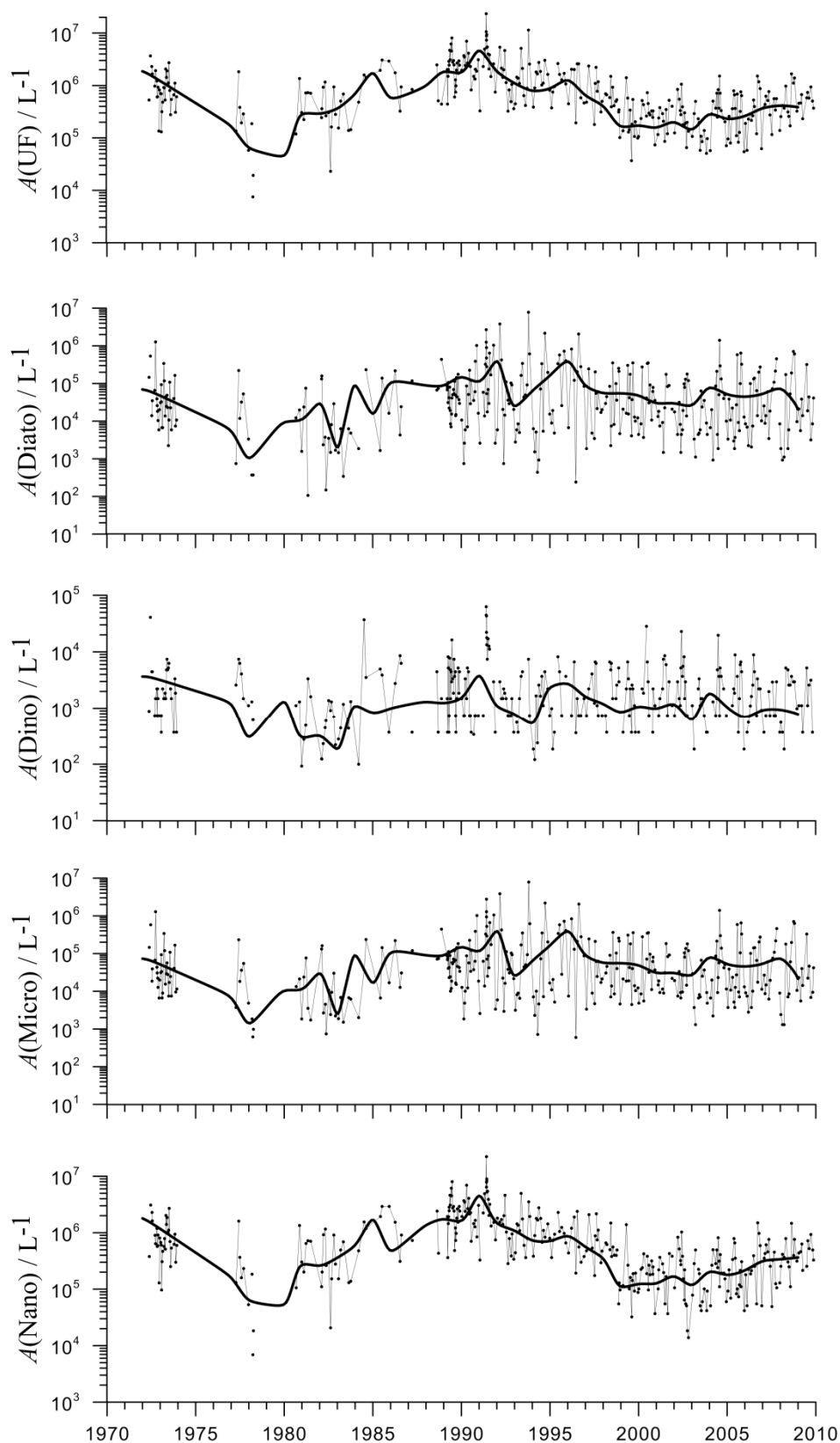
4.1.1.1 POSTAJA RV001

Vrijednosti abundancije ukupnog fitoplanktona na postaji RV001 na početku istraživanja dostizale su 10^6 stanica L^{-1} ($3,68 \times 10^6$ stanica L^{-1}). Najviša vrijednost srednjaka ukupnog fitoplanktona zabilježena je 1991., a nakon toga lagano pada do 2003. godine kad dostiže minimum. Od 2009. opet lagano raste.

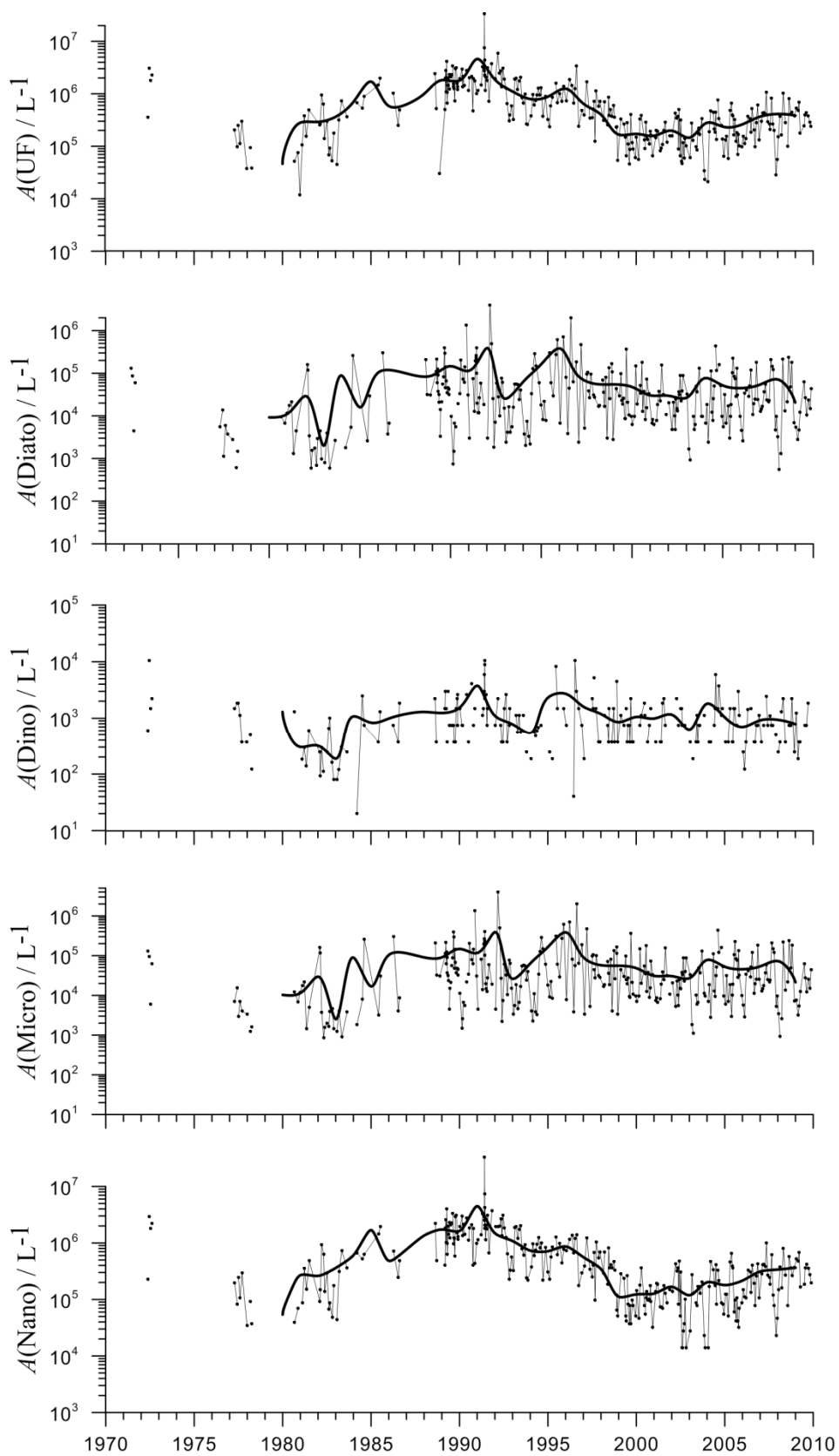
Abundancija dijatomeja u površinskom sloju postaje RV001 bila je za red veličine niža od ukupnog mikrofitoplanktona. Postoje dvije povišene vrijednosti srednjaka i to 1993. (830×10^3 stanica L^{-1}) i 1996. (446×10^3 stanica L^{-1}) godine zatim vrijednosti lagano padaju do 2003., a 2004. srednjak dostiže vrijednost od 165×10^3 stanica L^{-1} (Slika 4.1.). Abundancija dinoflagelata je za red veličine niža od one dijatomeja, a najviše vrijednosti srednjaka dostižu 10^4 stanica L^{-1} , iako su vrijednosti srednjaka uglavnom reda veličine 10^3 . Najviša vrijednost srednjaka dinoflagelata zabilježena je 1991. ($19,7 \times 10^3$ stanica L^{-1}). Nakon toga srednjaci i stvarne abundancije bile su prilično ujednačene. Abundancija mikrofitoplanktona ima vrlo slično kretanje dijatomejama. Najviša vrijednost srednjaka zabilježena je 1993. (833×10^3 stanica L^{-1}) i nakon toga pada, a još su dvije povišene vrijednosti srednjaka zabilježene 2004. (168×10^3 stanica L^{-1}) i 2008. (163×10^3 stanica L^{-1}). Abundancija nanofitoplanktona je najbližnja ukupnom fitoplanktonu s najvišom vrijednosti 1991. ($5,16 \times 10^6$ stanica L^{-1}), a minimalna vrijednost srednjaka zabilježena je 1999. (240×10^3 stanica L^{-1}).

U pridnom sloju postaje RV001 (Slika 4.2.) najviša vrijednost srednjaka abundancije ukupnog fitoplanktona zabilježena je 1991. ($4,62 \times 10^6$ stanica L^{-1}), a nakon toga lagano pada do 1999. (167×10^3 stanica L^{-1}) godine kad dostiže minimum. Do 2009. opet lagano raste s jednom višom vrijednosti 2004. (281×10^3 stanica L^{-1}). Abundancija dijatomeja u pridnom sloju postaje RV001 ima sličnu raspodjelu kao i u površinskom. Postoje

dvije povišene vrijednosti srednjaka i to 1992. (391×10^3 stanica L^{-1}) i 1996. (385×10^3 stanica L^{-1} , Slika 4.2.) zatim vrijednosti lagano padaju do 2003., a 2004. i 2008. srednjaci su opet lagano povišeni ($76,8\text{--}72,4 \times 10^3$ stanica L^{-1}). Abundancija dinoflagelata u pridnenom sloju ima prilično ujednačenu raspodjelu (srednjak i stvarne abundancije) i za red su veličine niži od dijatomeja i nešto niži od dinoflagelata u površinskom sloju. Najviše vrijednosti srednjaka dostižu 10^3 stanica L^{-1} . Najviša vrijednost srednjaka dinoflagelata zabilježena je 1991. ($3,77 \times 10^3$ stanica L^{-1}). Abundancija mikrofitoplanktona ima vrlo slično kretanje dijatomejama iz pridnenog sloja. Najviša vrijednost srednjaka zabilježena je 1991. ($4,62 \times 10^6$ stanica L^{-1}) i 1996. ($1,26 \times 10^6$ stanica L^{-1}) i nakon toga pada, a još su dvije povišene vrijednosti srednjaka zabilježene 2004. i 2008. Abundancija nanofitoplanktona je najbližija ukupnom fitoplanktonu. Najviša vrijednost srednjaka zabilježena je 1991. ($4,51 \times 10^6$ stanica L^{-1}), a minimalna 1999. (111×10^3 stanica L^{-1} ; Slika 4.2.).



Slika 4.1. Raspodjela površinskih vrijednosti abundancije (·) i srednjaka abundancije (stanica L^{-1}) (—) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diat), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) od 1972-2009. na postaji RV001.



Slika 4.2. Raspodjela pridnenih vrijednosti abundancije (·) i srednjaka abundancije (stanica L^{-1}) (-) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) od 1972-2009. na postaji RV001.

4.1.1.2 POSTAJA SJ107

Najviša vrijednost srednjaka ukupnog fitoplanktona u površinskom sloju postaje SJ107 zabilježena je 1985. ($4,79 \times 10^6$ stanica L^{-1}), a nakon toga je prilično ujednačena do 1996. kada počinje lagano padati, a 2000. (344×10^3 stanica L^{-1}) i 2003. (191×10^3 stanica L^{-1}) godine dostiže minimum. Godine 2004. zabilježena je lagano povišena vrijednost ($1,2 \times 10^6$ stanica L^{-1}).

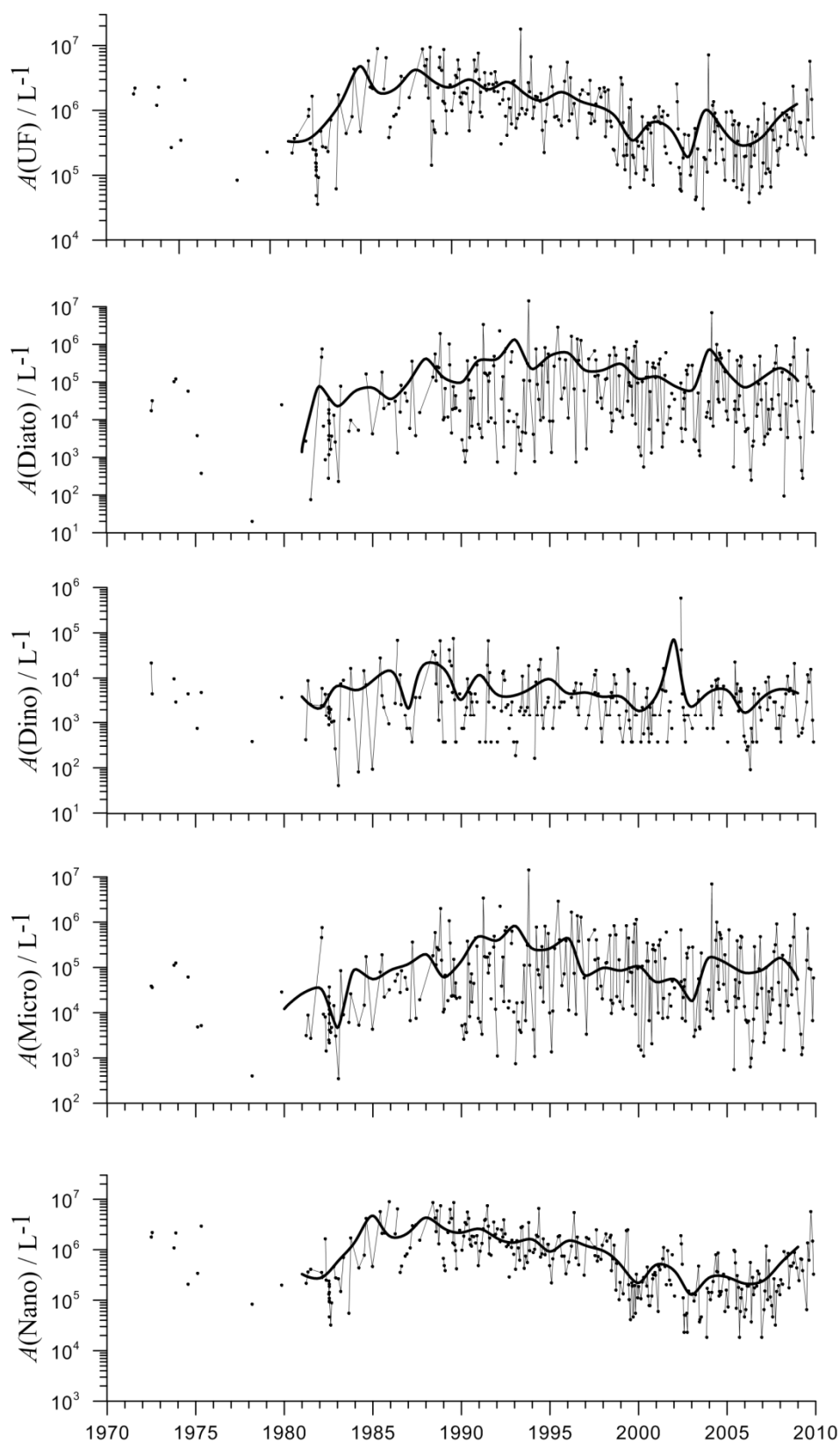
Abundancija dijatomeja u površinskom sloju postaje SJ107 imala je malo drugačije kretanje, te je njihova abundancija za red veličine niža, 10^5 stanica L^{-1} , od ukupnog mikrofitoplanktona. Povišena vrijednost srednjaka zabilježena je 1993. ($1,35 \times 10^6$ stanica L^{-1}) zatim vrijednosti lagano padaju do 2003., a 2004. srednjak dostiže vrijednost od 736×10^3 stanica L^{-1} (Slika 4.3.). Abundancija dinoflagelata bila je za red veličine niža od dijatomeja i najviše vrijednosti srednjaka dostižu 10^4 stanica L^{-1} . Najviša vrijednost srednjaka dinoflagelata zabilježena je 2002. ($71,2 \times 10^3$ stanica L^{-1}) i značajno je viša od ostatka podataka (Slika 4.3.).

Abundancija mikrofitoplanktona imala je vrlo slično kretanje dijatomejama. Najviša vrijednost srednjaka zabilježena je 1993. ($1,35 \times 10^6$ stanica L^{-1}) i nakon toga pada, a još su dvije povišene vrijednosti srednjaka zabilježene 2004. i 2008. (740×10^3 stanica L^{-1}).

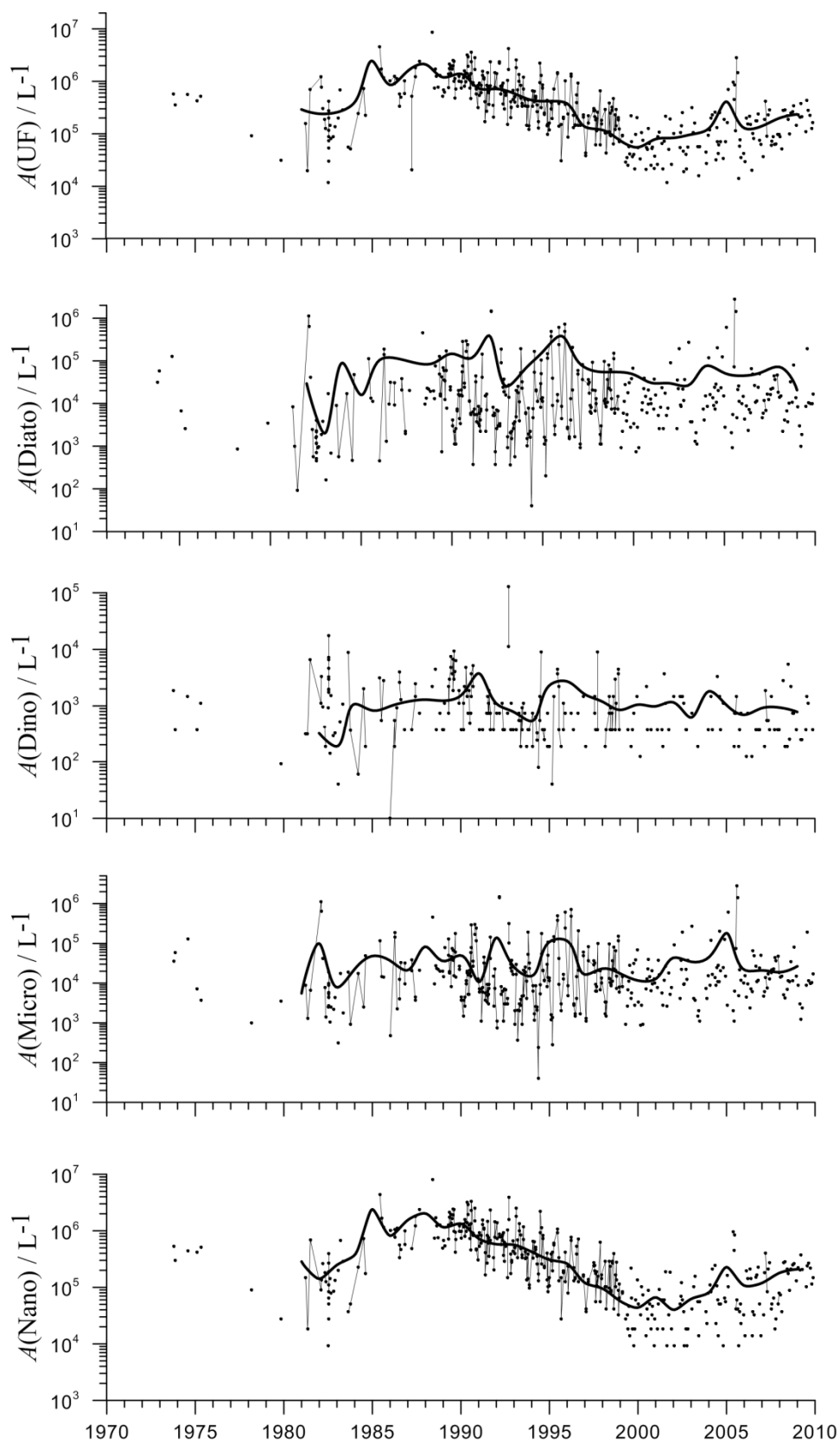
Abundancija nanofitoplanktona bila je najbližnja ukupnom fitoplanktonu s najvišom vrijednosti srednjaka zabilježenom 1985. ($4,71 \times 10^6$ stanica L^{-1}), i minimalnom 2000. (221×10^3 stanica L^{-1}).

U pridnenom sloju postaje SJ107 najviša vrijednost srednjaka ukupnog fitoplanktona zabilježena je 1985. ($2,46 \times 10^6$ stanica L^{-1}), a nakon toga lagano pada do 2000. kad dostiže minimum ($55,3 \times 10^3$ stanica L^{-1}). Do 2009. opet lagano raste s jednom višom vrijednosti 2005. godine (411×10^3 stanica L^{-1}). Abundancija dijatomeja u pridnenom sloju postaje SJ107 imala je sličnu raspodjelu kao i u površinskom sloju i srednjak je prilično ujednačen bez nekih velikih odstupanja. Abundancija dinoflagelata u pridnenom sloju imala je prilično ujednačenu raspodjelu (srednjak i stvarne abundancije) i za red veličine niže su od dijatomeja i nešto niži od dinoflagelata u površinskom sloju (10^2 - 10^3). Najviša vrijednost srednjaka dinoflagelata zabilježena je 1992. ($2,89 \times 10^3$ stanica L^{-1} ; Slika 4.4.).

Abundancija mikrofitoplanktona pridnenog sloja imala je vrlo slično kretanje dijatomejama. Najviša vrijednost srednjaka zabilježena je 1992. (130×10^3 stanica L^{-1}), 1996. (116×10^3 stanica L^{-1}) i 2005. (182×10^3 stanica L^{-1}). Abundancija nanofitoplanktona bila je najsličnija ukupnom fitoplanktonu s najvišom vrijednosti srednjaka zabilježenom 1985. ($2,40 \times 10^6$ stanica L^{-1}) i minimalnom 2000. ($43,7 \times 10^3$ stanica L^{-1}).



Slika 4.3. Raspodjela površinskih vrijednosti abundancije (·) i srednjaka abundancije (-) (stanica L^{-1}) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diat), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) od 1972-2009. na postaji SJ107.

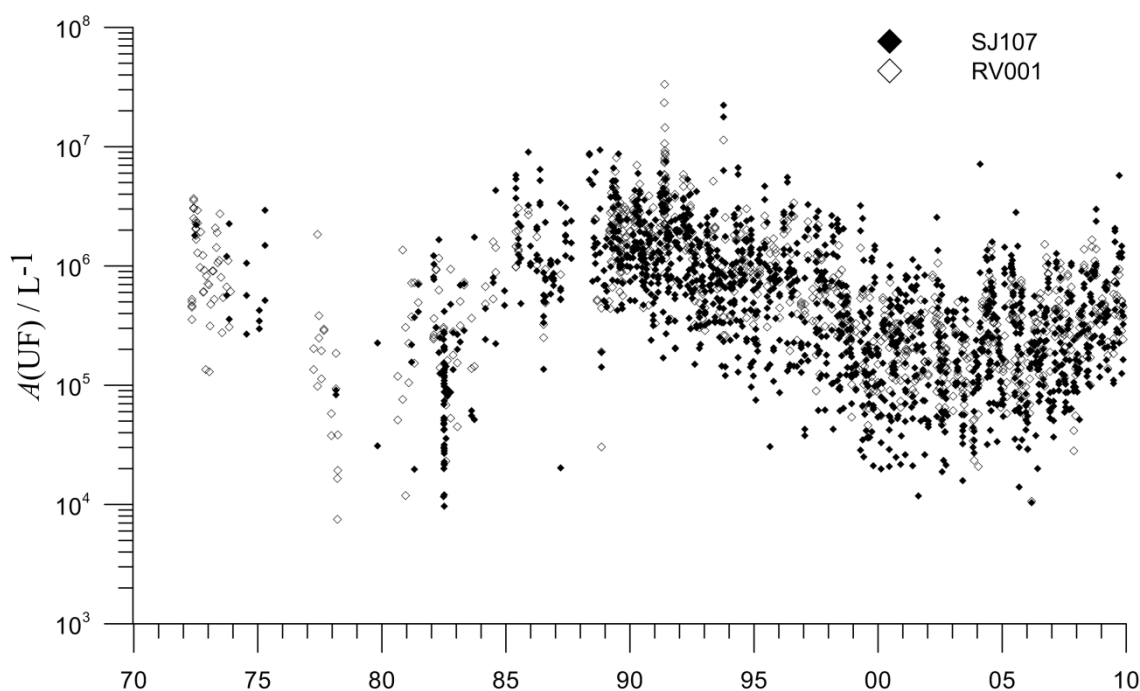


Slika 4.4. Raspodjela pridnenih vrijednosti abundancije (·) i srednjaka abundancije (-) (stanica L^{-1}) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diat), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) od 1972-2009. na postaji SJ107.

4.2 ODREĐIVANJE RAZDOBLJA

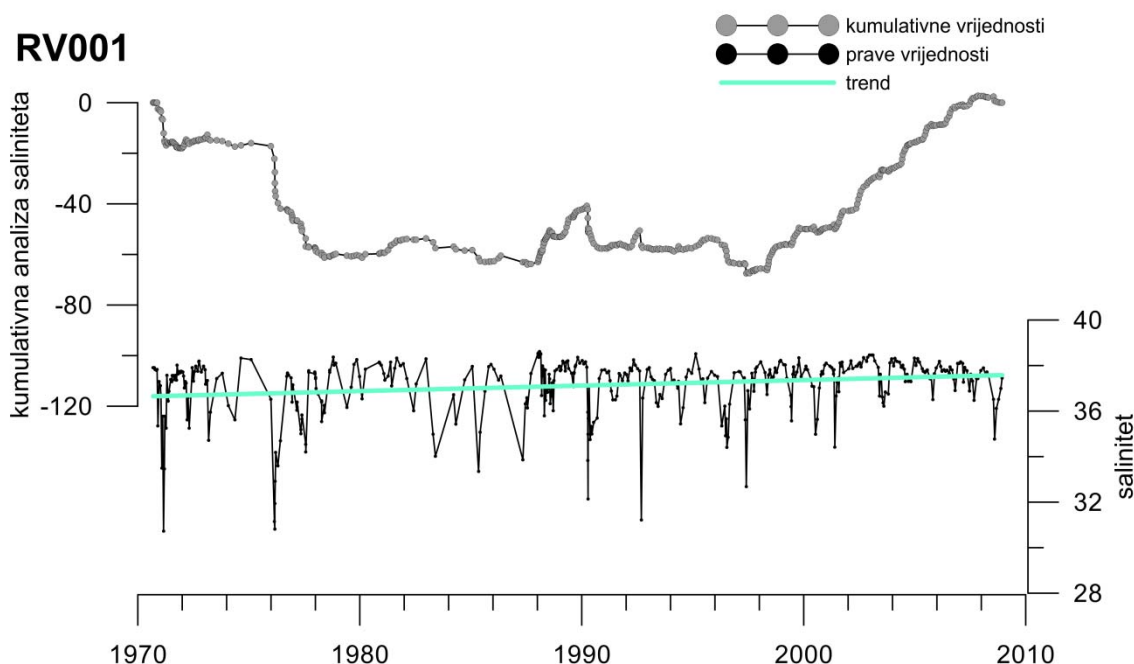
Pokušano je uočiti razdoblja sličnog ponašanja raspodjele podataka, te vidjeti da li se oni statistički značajno razlikuju.

Od 1972. do kraja 2009. većina uzoraka fitoplanktona pokazala je veliku prostornu, sezonsku i godišnju promjenjivost. Prave vrijednosti abundancije za ukupni fitoplankton za sve dubine prikazani su na Slici 4.5. Razdoblje najviše abundancije bilo je krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog stoljeća. Tada je abundancija počela opadati i svoj minimum dosegla između 1999. i 2003. Vrijednosti abundancije ukupnog fitoplanktona u istraživanom razdoblju kreću se od 10^3 do 10^8 stanica po litri, a distribucija vrijednosti prikazana je na logaritamskoj skali (Tablica 4.1. i Slika 4.5.). Iako je zbog logaritamske distribucije srednja vrijednost pod utjecajem ekstremnih vrijednosti, ipak se logaritamska distribucija najviše koristi pogotovo kada je raspon vrijednosti tako velik.



Slika 4.5. Raspodjela abundancije (stanica L^{-1}) ukupnog fitoplanktona (UF) od 1972-2009. na postajama RV001(\diamond) i SJ107(\blacklozenge).

Kumulativni prikaz saliniteta napravljen je s ciljem otkrivanja velikih promjena u ekosustavu. Korištene su prosječne mjesečne vrijednosti saliniteta na godišnjoj skali kao prosječna vrijednost, te je iz nje izgrađen graf kumulativnog zbroja saliniteta.



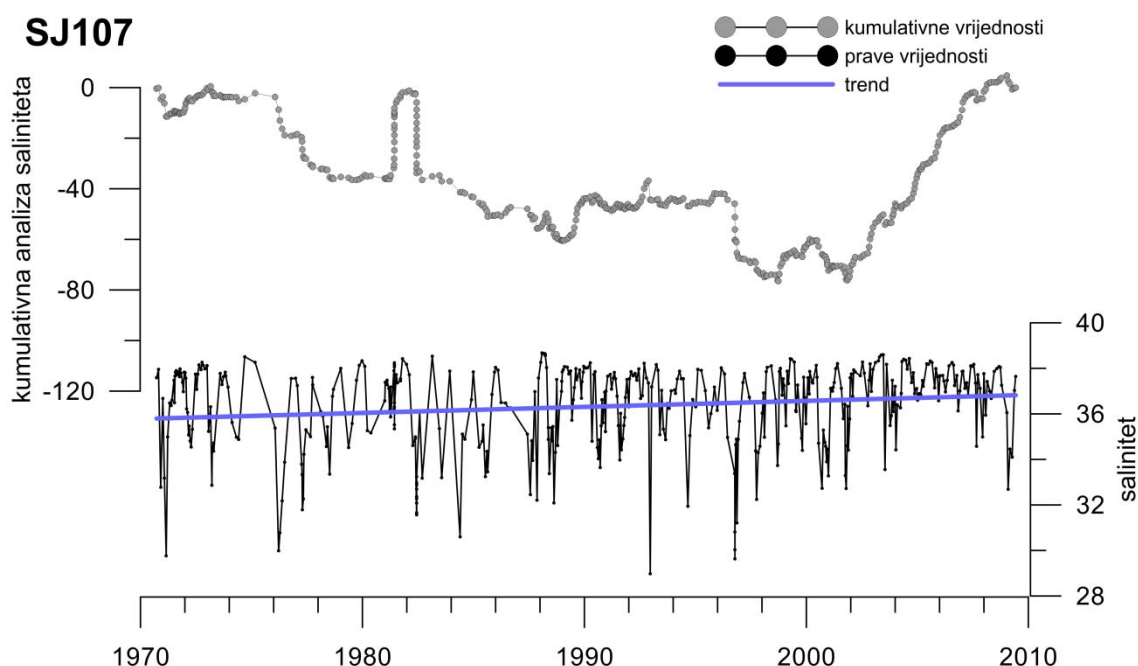
Slika 4.6. Salinitet kroz istraživano razdoblje za postaju RV001. Prva krivulja pokazuje kumulativnu analizu saliniteta. Linija u boji označava trend a crna linija prave vrijednosti.

Stalni pad ili rast kumulativne linije označavaju sustavno više ili niže vrijednosti od prosjeka, dobivenih iz cijelog skupa podataka.

Budući da se na osnovi fitoplanktonskih podataka nismo mogli odlučiti kako da podijelimo razdoblja analizirali smo i okolišne parametre uključujući temperaturu, salinitet i hranjive soli. Salinitet je prikazan kao kumulativna vrijednost kako bi se lakše zamijetile moguće promjene koje su se dogodile u istraživanom razdoblju. Na postaji RV001 utvrđeno je da je salinitet bio niži od prosjeka u sedamdesetim godinama prošlog stoljeća nakon čega je uslijedilo stabilnije razdoblje do 1980./2000., a nakon toga zabilježene vrijednosti bile su sustavno više od prosjeka osobito nakon 2000. što se podudara s nižim donosom rijeke Po zadnjih nekoliko godina, te promjenama u kruženju morskih struja. Razlike između minimalnih raspona i srednjih vrijednosti saliniteta između dva razdoblja donosi Tablica 4.1. Na postaji RV001 minimum saliniteta u razdoblju od 1972-1990. bio je 31,15, dok je u drugom razdoblju (2000-2009.) zabilježeni minimum 34,42.

Na postaji SJ107 oscilacije saliniteta bile su nešto više nego na postaji RV001, ali su zabilježeni slični trendovi. Na ovoj su postaji vrijednosti saliniteta sustavno više od

prosjeaka od 1998-2000. Vrijednosti su sustavno niže od prosjeka kroz kraće vremensko razdoblje, te su od 2003. godine sustavno više od prosjeka. Iako se razdoblja ne podudaraju u potpunosti na dvije istraživane postaje i za različite parametre izabrana je 2000. kao godina promjene, te su određena dva istraživana razdoblja: od 1972-1999. i od 2000-2009. godine. Ovo su potvrdili i podaci za fitoplankton. Shodno tome, većina analiza i grafičkih prikaza podataka temelji se na ova dva razdoblja. Razlike između najnižih (min), najviših (max) vrijednosti, te raspona i srednjih vrijednosti saliniteta između dva razdoblja donosi Tablica 4.2. Na postaji SJ107 najniža vrijednost saliniteta u prvom razdoblju bila je 28,98 dok je u drugom 32,69. Prosječna vrijednost i standardna devijacija saliniteta nisu se značajno promijenile naime od 37,40 (5,07) na 37, 62 (5,25).



Slika 4.7. Salinitet kroz istraživano razdoblje za postaju SJ107. Prva krivulja pokazuje kumulativna analiza saliniteta. Linija u boji označava trend a crna linija prave vrijednosti.

U Tablicama 4.1. i 4.2. uspoređene su najniže (min) i najviše (max) vrijednosti abundancije ukupnog fitoplanktona, dijatomeja, dinoflagelata, mikrop planktona i nanofitoplanktona na obje postaje u dva razdoblja. Izračunata je srednja vrijednost, kao i raspon od najnižih do najviših vrijednosti abundancije i standardna devijacija. U tablicama su također navedene najniže (min) i najviše (max) koncentracije fizikalno-kemijskih parametara (nitrita, nitrata, amonija, otopljenig anorganskog dušika, ortofosfata, ortosilikata) za dva istraživana razdoblja 1972-1999. i 2000-2009. za

postaje RV001 i SJ107. Najznačajnije promjene vidljive su u smanjenim koncentracijama ortofosfata i ortosilikata u drugom razdoblju kao i povećanoj koncentraciji otopljenih anorganskog dušika u drugom razdoblju, koji zaostaje kao suvišak u ekosustavu.

Tablica 4.1. Minimalne (min), maksimalne (max) vrijednosti, srednja vrijednost (avg), raspon i standardna devijacija (s.d.) fizikalno-kemijskih parametara i abundancije ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikropilanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u oba istraživana razdoblja 1972-1999. i 2000-2009. za postaju RV001.

Parametar	N	min	max	raspon	avg	s.d.
Razdoblje: 1972 - 1999						
$t/^{\circ}\text{C}$	561	7,93	26,98	19,05	16,29	4,59
S	562	31,15	38,86	7,71	37,43	0,98
$\gamma/\text{kg m}^{-3}$	561	21,69	29,96	8,27	27,46	1,59
$c(\text{PO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	546	< l.d.	0,30	0,30	0,03	0,04
$c(\text{NO}_3)/\mu\text{mol L}^{-1}$	550	< l.d.	5,65	5,65	0,59	0,65
$c(\text{NO}_2)/\mu\text{mol L}^{-1}$	550	< l.d.	1,22	1,22	0,19	0,24
$c(\text{NH}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	534	< l.d.	10,34	10,34	0,48	0,69
$c(\text{DIN})/\mu\text{mol L}^{-1}$	534	0,03	11,10	11,07	1,27	1,09
$c(\text{SiO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	544	< l.d.	19,49	19,49	3,47	2,91
$A(\text{UF}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	562	7515	33,3	33,3	1,6	2,31
$A(\text{Diato}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	559	100	7,8	7,8	0,16	0,49
$A(\text{Dino}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	473	40	0,063	0,063	0,003	0,006
$A(\text{Micro}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	562	460	7,8	7,81	0,16	0,49
$A(\text{Nano}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	557	6900	33,1	33,1	1,4	2,18
Razdoblje: 2000 - 2009						
$t/^{\circ}\text{C}$	368	8,17	26,73	18,56	16,92	5,08
S	365	34,42	38,46	4,04	37,80	0,53
$\gamma/\text{kg m}^{-3}$	365	23,12	29,81	6,69	27,58	1,47
$c(\text{PO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	< l.d.	0,25	0,25	0,02	0,03
$c(\text{NO}_3)/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	0,07	8,20	8,13	0,94	0,89
$c(\text{NO}_2)/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	0,01	3,04	3,03	0,23	0,31
$c(\text{NH}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	< l.d.	3,50	3,50	0,32	0,34
$c(\text{DIN})/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	0,18	8,93	8,75	1,49	1,14
$c(\text{SiO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	368	0,08	13,49	13,41	2,68	1,86
$A(\text{UF}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	368	10670	1,66	1,65	0,33	0,27
$A(\text{Diato}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	368	555	1,4	1,4	0,07	0,14
$A(\text{Dino}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	290	120	0,028	0,028	0,002	0,003
$A(\text{Micro}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	368	960	1,4	1,39	0,07	0,14
$A(\text{Nano}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	367	13800	1,5	1,49	0,26	0,23

kratice – broj uzoraka (N), minimum abundancije (min), maksimum abundancije (max), raspon od min do max (Raspon), srednja vrijednost (avg) i standardna devijacija (s.d.), < l.d. ispod limita detekcije

Tablica 4.2. Minimalne (min), maksimalne vrijednosti (max), Srednja vrijednost (avg), raspon i standardna devijacija (s.d.) fizikalno-kemijskih parametara i abundancije ukupnog fitoplanktona (UK), dijatomeja (Diat), dinoflagelata (Dino), mikropilanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u oba istraživana razdoblja 1972-1999. i 2000-2009. za postaju SJ107.

Parametar	N	min	max	raspon	avg	s.d.
Razdoblje: 1972 - 1999						
$t/^{\circ}\text{C}$	895	7,03	27,8	20,77	15,95	5,07
S	895	28,98	38,77	9,79	37,40	1,23
$\gamma_t/\text{kg m}^{-3}$	893	19,74	30,02	10,28	27,51	1,88
$c(\text{PO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	891	< l.d.	0,59	0,59	0,03	0,05
$c(\text{NO}_3)/\mu\text{mol L}^{-1}$	880	< l.d.	7,54	7,54	0,72	0,89
$c(\text{NO}_2)/\mu\text{mol L}^{-1}$	886	< l.d.	3,74	3,74	0,26	0,40
$c(\text{NH}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	885	< l.d.	3,28	3,28	0,45	0,53
$c(\text{DIN})/\mu\text{mol L}^{-1}$	875	0,02	8,99	8,97	1,43	1,22
$c(\text{SiO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	890	< l.d.	31,59	31,59	4,52	4,58
$A(\text{UF}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	897	9700	22,3	22,2	1,24	1,60
$A(\text{Diat}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	888	40	19,8	19,8	0,17	0,89
$A(\text{Dino}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	711	40	0,128	0,128	0,004	0,008
$A(\text{Micro}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	897	40	19,8	19,8	0,17	0,88
$A(\text{Nano}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	892	9200	8,96	8,95	1,07	1,24
Razdoblje: 2000 - 2009						
$t/^{\circ}\text{C}$	592	6,97	27,84	20,87	16,75	5,25
S	587	32,69	38,66	5,97	37,62	0,96
$\gamma_t/\text{kg m}^{-3}$	587	21,41	29,73	8,32	27,48	1,78
$c(\text{PO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	592	< l.d.	0,29	0,29	0,03	0,04
$c(\text{NO}_3)/\mu\text{mol L}^{-1}$	592	0,04	12,67	12,63	1,05	1,21
$c(\text{NO}_2)/\mu\text{mol L}^{-1}$	592	< l.d.	4,20	4,19	0,25	0,33
$c(\text{NH}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	590	< l.d.	3,19	3,19	0,35	0,45
$c(\text{DIN})/\mu\text{mol L}^{-1}$	590	0,17	13,67	13,50	1,65	1,49
$c(\text{SiO}_4)/\mu\text{mol L}^{-1}$	592	< l.d.	26,75	26,75	2,89	3,08
$A(\text{UF}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	592	10360	7,12	7,11	0,035	0,51
$A(\text{Diat}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	591	80	6,97	6,97	0,12	0,36
$A(\text{Dino}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	440	80	0,586	0,586	0,004	0,003
$A(\text{Micro}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	592	370	6,98	6,98	0,012	0,37
$A(\text{Nano}) 10^6 \text{ stanica L}^{-1}$	590	9200	5,63	5,62	0,023	0,34

kratice – broj uzoraka (N), minimum abundancije (min), maksimum abundancije (max), raspon od min do max (Raspon), srednja vrijednost (avg) i standardna devijacija (s.d.), < l.d. ispod limita detekcije

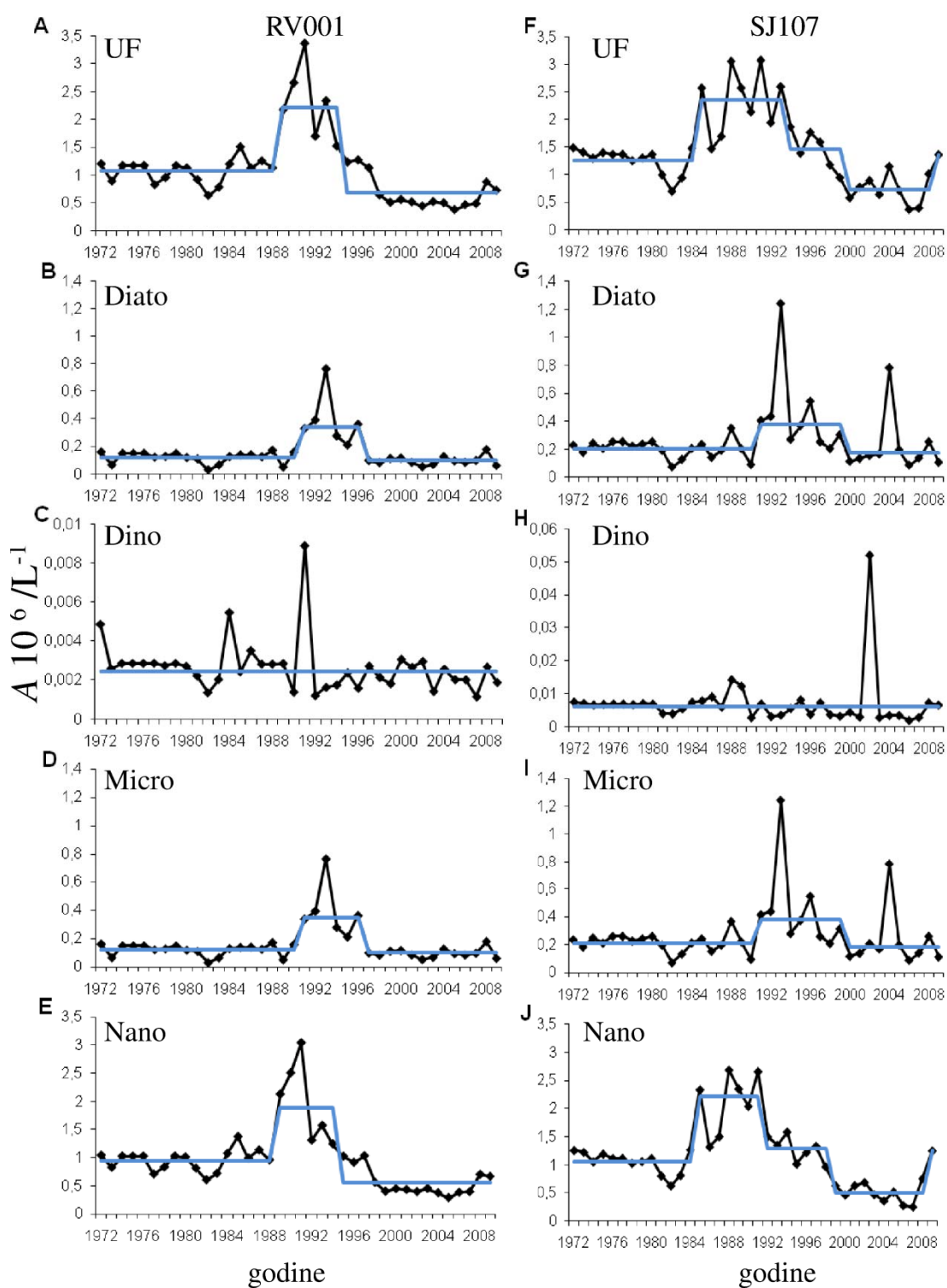
4.3 ANALIZA PRIJELOMNIH RAZDOBLJA

Analizom prijelomnih razdoblja (sustavni pomak engl. *Regime shift* - RS) testirali smo srednju vrijednost abundancije ukupnog fitoplanktona, dijatomeja, dinoflagelata mikropilanktona i nanofitoplanktona u razdoblju od 1972-2009. na obje istraživane postaje.

Ova analiza temelji se na parametrijskoj metodi, a koristi sekvencijalni *t*-test koji otkriva statistički značajne pomake srednje vrijednosti abundancije i jačinu promjene koja se dogodila. Pomak nastaje kada postoji značajna razlika prije i nakon određene točke u vremenu i nazvan je sustavni pomak (engl. *Regime shift*).

Analiza prijelomnih razdoblja (engl. *Regime shift*) na fitoplanktonskim podacima pokazala je nekoliko bitnih pomaka sustava. Analizom ukupnog fitoplanktona (Slika 4.8.) vidljivo je da je razdoblje najviše abundancije na postaji RV001 bilo od 1988. do 1995. nakon čega je uslijedio razdoblje niže abundancije koje se održalo do kraja istraživanog razdoblja. Abundancija dijatomeja je rasla do 1990., a razdoblje visoke abundancije zadržalo se do 1996. (Slika 4.8.B) nakon toga uslijedio je pad. Analiza prijelomnih razdoblja za dinoflagelate (Slika 4.8.C) nije zabilježila nikakav značajniji pomak u abundanciji kroz cijelo istraživano razdoblje. Abundancija mikropilanktona (Slika 4.8.D) imala je slične trendove rasta i pada kao i dijatomeje, dok je abundancija nanofitoplanktona slijedila ponašanje ukupnog fitoplanktona s uzlaznim trendom u 1987. i snažnim silaznim trendom 1994. na postaji RV001.

Abundancija ukupnog fitoplanktona na postaji SJ107 rasla je od 1984., a razdoblje visoke abundancije održalo se do 1993. Nakon toga uslijedio je lagani pad do 2000., a potom i značajan pad abundancije do 2008. (Slika 4.8.F). Abundancija dijatomeje bila je najviša u razdoblju od 1988. do 2000., nakon čega je zabilježeno razdoblje niže abundancije (Slika 4.8.G). Abundancija dinoflagelata ni na ovoj postaji nije pokazala značajnije pomake u čitavom istraživanom razdoblju (Slika 4.8.H). Za abundanciju mikropilanktona zabilježeni su slični pomaci dijatomejama: uzlazni trend od 1989. i silazni oko 2000. godine (Slika 4.8.). Abundancija nanofitoplanktona (Slika 4.8.) imala je rastući trend od 1982., a zatim pad 1994. i 2000. da bi ponovno počela rasti posljednjih nekoliko godina.



Slika 4.8. Analiza prijelomnih razdoblja (*Regime shift*) površinskih vrijednosti abundancije (stanica L⁻¹) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) od 1972-2009. na postajama RV001 i SJ107.

4.4 KORELACIJE ABUNDANCIJE FITOPLANKTONA I EKOLOŠKIH PARAMETARA – PCA

Za analizu fitoplanktonskih i okolišnih podataka korištena je analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis* - PCA) koja omogućuje usporedbu abundancije fitoplanktona ovisno o ekološkim čimbenicima. Rezultati PCA analize prikazani su u Tablicama 4.3. i 4.4. Na postaji SJ107 PC1 u svim slučajevima bila je pod utjecajem promjene saliniteta, koje su obično korelirane sa strujama ili varijacijama hranjivih soli. Prilike su bile složenije na postaji RV001 gdje je PC1 bio pod utjecajem temperature, saliniteta i hranjivih soli ili kombinacije svih triju. PC2 je na obje postaje korelirao s koncentracijom ortosilikata. Velike abundancije fitoplanktona na obje istraživane postaje obično su se poklopile sa sniženim vrijednostima saliniteta. U ožujku i listopadu visoka abundancija fitoplanktona na postaji SJ107 bila je povezana s visokom koncentracijom otopljenog anorganskog dušika (DIN), dok je na postaji RV001 bila u korelaciji s koncentracijom ortofosfata.

Tablica 4.3. Dio ukupne varijance koje opisuju PC1 i PC2 (% V) na postaji RV001. Vrijednosti za analizirane mjesece (veljaču, ožujak, svibanj i listopad) za dijatomeje (Diat), dinoflagelate (Dino) i nanofitoplankton (Nano). Parametri su salinitet (*S*), temperatura (*t*), otopljeni anorganski dušik (DIN), ortofosfati (PO_4), ortosilikati (SiO_4) i intenzitet geostrofičkih struja (Curr). Negativni koeficijenti su označeni predznakom (-)

		PC1-RV001		PC2-RV001	
		%V	Koeficijent	%V	Koeficijent
Veljača	Diat	31,2	Diat (0,6)	24,7	- <i>S</i> , PO_4 , -Curr, SiO_4 , -DIN (0,4-0,5)
	Dino	26,2	- <i>S</i> , -Curr, Dino (0,3-0,7)	23,1	<i>t</i> , - PO_4 , DIN, - SiO_4 (0,4-0,6)
	Nano	29,3	- <i>S</i> , Nano, -Curr (0,5-0,6)	22,5	<i>t</i> , - PO_4 , DIN (0,4-0,7)
Ožujak	Diat	29,9	Diat, PO_4 (0,5-0,6)	23,1	- SiO_4 , DIN, -Curr, <i>S</i> (0,3-0,6)
	Dino	28,4	Dino, <i>S</i> , PO_4 (0,4-0,6)	23,8	DIN, -Curr, - SiO_4 (0,5-0,6)
	Nano	25,7	-DIN, Curr, Nano (0,4-0,6)	21,8	- SiO_4 , PO_4 , <i>S</i> (0,4-0,6)
Svibanj	Diat	32,4	<i>t</i> , -DIN, Diato (0,5-0,6)	25	- SiO_4 , Curr, PO_4 (0,5-0,6)
	Dino	29,5	<i>t</i> , - PO_4 , -DIN (0,5-0,6)	26	- SiO_4 , Curr, - <i>S</i> , Dino (0,4-0,6)
	Nano	29	- <i>t</i> , PO_4 , - <i>S</i> , Nano (0,2-0,6)	23,4	SiO_4 , -Curr, DIN (0,5-0,6)
Listopad	Diat	38,5	- <i>S</i> , Diato, PO_4 , Curr, - <i>t</i> (0,3-0,6)	19,4	- SiO_4 , -DIN (0,5-0,8)
	Dino	35,6	- <i>S</i> , DIN, PO_4 , Dino, - <i>t</i> (0,3-0,5)	18,2	- SiO_4 , Curr (0,5-0,8)
	Nano	41,7	Nano, - <i>S</i> , PO_4 , - <i>t</i> , DIN (0,3-0,5)	18,1	SiO_4 , -Curr (0,6-0,8)

Geostrofičke struje (pokazatelj anticiklonalnog vrtloga i Istarske Obalne Protustruje (engl. *Istrian Coastal Countercurrent* - ICCC) između SJ107 i RV001 češće su bile povezane s cvjetanjem fitoplanktona na postaji SJ107 nego na RV001, jer unatoč zatvorenoj cirkulaciji voda rijeke Po češće stigne do SJ107 nego do RV001 (Supić i sur., 2001). Temperatura je povremeno bila korelirana s visokim abundancijama dijatomeja, dinoflagelata i nanofitoplanktona. Ortosilikati na postaji SJ107 nisu imali značajne korelacije s abundancijama fitoplanktonskih grupa.

Ortofosfati su značajno korelirali s abundancijom dijatomeja na postaji SJ107 u veljači i na postaji RV001 u ožujku i listopadu. Abundancija dinoflagelata je značajno korelirala s ortofosfatima na postaji SJ107 u listopadu i na postaji RV001 u ožujku i listopadu. Abundancija nanofitoplanktona je korelirala s ortofosfatima na postaji SJ107 u listopadu i na postaji RV001 u svibnju i listopadu (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Dio ukupne varijance koje opisuju PC1 i PC2 (% V) na postaji SJ107. Vrijednosti za analizirane mjesece (veljaču, ožujak, svibanj i listopad) za dijatomeje (Diat), dinoflagelate (Dino) i nanofitoplankton (Nano). Parametri su salinitet (*S*), temperatura (*t*), otopljeni anorganski dušik (DIN), ortofosfati (PO_4), ortosilikati (SiO_4) i intenzitet geostrofičkih struja (Curr). Negativni koeficijenti su označeni predznakom (-).

		PC1-SJ107		PC2-SJ107	
		% V	Koeficijent	% V	Koeficijent
Veljača	Diat	55,8	- <i>S</i> , - <i>t</i> , Curr, PO_4 , Diato (0,4)	18,9	- SiO_4 , -DIN (0,6-0,8)
	Dino	51	Curr, - <i>S</i> , - <i>t</i> , PO_4 (0,4)	21,8	- SiO_4 , -DIN, Dino (0,4-0,7)
	Nano	47,2	- <i>S</i> , Curr, - <i>t</i> , PO_4 (0,4-0,5)	20,0	- SiO_4 , Nano, -DIN (0,4-0,8)
Ožujak	Diat	41,7	- <i>S</i> , DIN, Diato (0,5)	28,4	- SiO_4 , PO_4 , - <i>t</i> (0,4-0,6)
	Dino	39,8	DIN, - <i>S</i> , <i>t</i> , Dino (0,4-0,5)	25,1	- PO_4 , SiO_4 , -Curr (0,5-0,6)
	Nano	38,6	DIN, - <i>S</i> , <i>t</i> , Nano (0,4-0,5)	25	PO_4 , - SiO_4 , Curr (0,5)
Svibanj	Diat	32,6	<i>S</i> , -Curr, - PO_4 (0,5-0,6)	26,6	<i>t</i> , Diato, SiO_4 , DIN (0,4-0,5)
	Dino	42,3	- <i>S</i> , Dino, Curr (0,4-0,5)	24,3	- PO_4 , DIN, SiO_4 (0,5)
	Nano	34,4	<i>S</i> , -Curr, - PO_4 (0,4-0,5)	24,5	- SiO_4 , -DIN, - <i>t</i> (0,4-0,6)
Listopad	Diat	38,5	- <i>S</i> , DIN, Curr, Diato (0,4-0,5)	19,7	- SiO_4 , <i>t</i> (0,5-0,7)
	Dino	41	- <i>S</i> , Dino, Curr, PO_4 (0,4-0,5)	20,9	- SiO_4 , <i>t</i> , -DIN (0,5-0,6)
	Nano	42,3	- <i>S</i> , Nano, DIN, PO_4 , Curr (0,4-0,5)	19,7	SiO_4 , - <i>t</i> (0,4-0,7)

Abundancija dijatomeja na postaji SJ107 pozitivno je korelirala s otopljenim dušikom u ožujku, svibnju i listopadu. Abundancija dinoflagelata na postaji SJ107 pozitivno je

korelirala s otopljenim dušikom u ožujku, a na postaji RV001 u listopadu. Abundancija nanofitoplanktona pozitivno je korelirala s otopljenim dušikom na postaji SJ107 u ožujku i listopadu i u listopadu na postaji RV001.

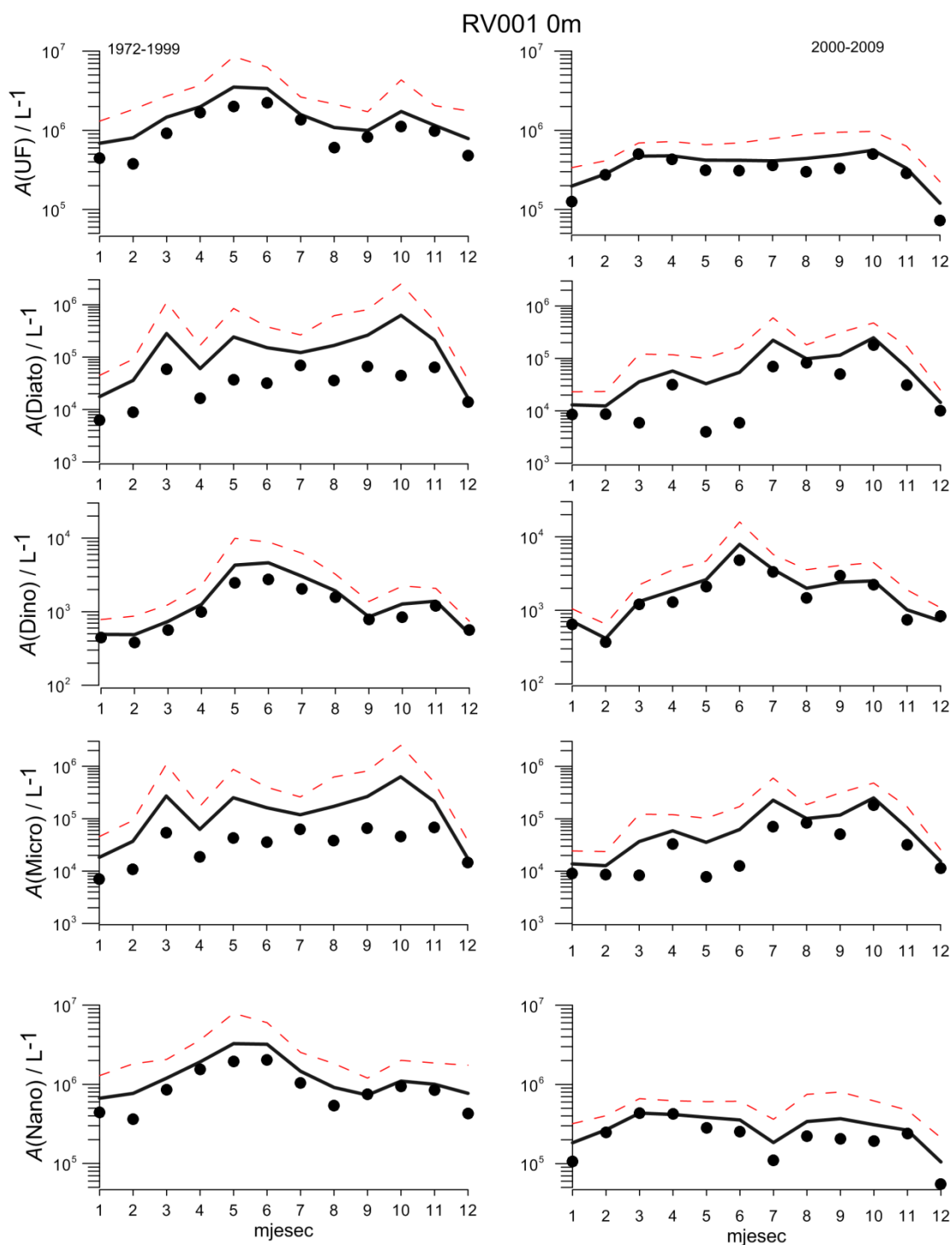
4.5 SEZONSKA RASPODJELA ABUNDANCIJE FITOPLANKTONA - USPOREDBA DVA RAZDOBLJA

4.5.1 UKUPNI FITOPLANKTON

U prvom istraživanom razdoblju srednjak abundancije ukupnog fitoplanktona bio je značajno viši nego u drugom na obje istraživane postaje. Osim promjene abundancije primijećena je i promjena u godišnjem ciklusu cvjetanja fitoplanktona. U prvom razdoblju najveće abundancije fitoplanktona na postaji RV001 zabilježene su od travnja do srpnja, a druga najviša vrijednost dostizana je u listopadu (Slika 4.9.). Apsolutno najviša vrijednost abundancije prvog istraživanog razdoblja zabilježena je u svibnju 1991. ($33,3 \times 10^6$ stanica L^{-1} , Tablica 4.1.). U drugom istraživanom razdoblju, najviše abundancije zabilježene su u razdoblju od ožujka do travnja i u listopadu. Najviša vrijednost abundancije u drugom razdoblju zabilježena je u kolovozu 2008. ($1,66 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.1., Slika 4.9.).

U prvom istraživanom razdoblju na postaji SJ107 visoke abundancije zabilježene su u svibnju, kolovozu i listopadu (Slika 4.10.). Najviša vrijednost abundancije dostignuta je tijekom listopada 1993. u površinskom sloju ($22,3 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.2.). Medijani u svibnju i kolovozu vrlo su slični prosječnim vrijednostima, dok je medijan u listopadu nešto niži od prosječnog broja.

U drugom promatranom razdoblju (2000-2009.) došlo je do pomaka u sezonalnosti ukupnog fitoplanktona kada su najviše abundancije zabilježene u veljači, svibnju i rujnu-listopadu (Slika 4.10.). Medijan u veljači znatno je niži od prosjeka što nam ukazuje da je nekoliko visokih vrijednosti utjecalo na prosjek, dok su medijani u svibnju i listopadu blizu srednjaka. Najviša vrijednost proljetnog cvjetanja zabilježena je u veljači 2004. ($7,12 \times 10^6$ stanica L^{-1} , Tablica 4.2.), a jesenskog cvjetanja u listopadu 2009. ($5,72 \times 10^6$ stanica L^{-1} , Tablica 4.2.). Obje vrijednosti zabilježene su pri vrlo niskom salinitetu.



Slika 4.9. Usporedba godišnje raspodjele površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (stanica L^{-1}), mediana (●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999. i od 2000-2009. na postaji RV001.

4.5.2 DIJATOMEJE

Na postaji RV001 zabilježena je veća abundancija dijatomeja u prvom nego u drugom razdoblju (Slika 4.9.) s očitim pomakom u razdobljima cvjetanja. U prvom razdoblju, dijatomeje su cvjetale u ožujku, svibnju i listopadu. Srednja prosječna vrijednost bila je viša od medijana u sva tri mjeseca što govori da su velika povremena cvjetanja (npr. 1993.) povisila vrijednosti srednjaka.

U drugom istraživanom razdoblju izostalo je rano proljetno cvjetanje i vrijednost medijana za ožujak se značajno smanjila u usporedbi s prvim razdobljem (Slika 4.9.).

Povećana vrijednost srednjaka zabilježena je u srpnju i listopadu (Slika 4.9.). Medijani su bili najviši u kolovozu i listopadu. Najviša vrijednost abundancije dijatomeja u prvom istraživanom razdoblju zabilježena je u listopadu 1993. ($7,80 \times 10^6$ stanica L^{-1} , Tablica 4.1.), a za drugo istraživano razdoblje u srpnju 2004. ($1,40 \times 10^6$ stanica L^{-1} Tablica 4.1.).

Na postaji SJ107 najviše abundancije dijatomeja bile su u ožujku, svibnju-lipnju i listopadu (Slika 4.10.). Medijani su bili niži od mjesečnih prosjeka u ožujku i listopadu. Najviša izmjerena vrijednost prvog razdoblja zabilježena je tijekom jesenskog cvjetanja 1993. ($19,8 \times 10^6$ stanica L^{-1}).

U drugom istraživanom razdoblju vrijednosti srednjaka bile su niže, a zabilježena su cvjetanja u veljači, srpnju i listopadu. Dogodio se pomak u cvjetanju, ranoproljetno cvjetanje pomaknulo se na veljaču iako je medijan za taj mjesec bio znatno niži od mjesečne vrijednosti srednjaka. Cvjetanje vrste *Skeletonema marinoi* iz 2004. utjecalo je na povišenu vrijednost srednjaka. Za cvjetanja u srpnju i listopadu medijani su bili vrlo slični vrijednostima srednjaka što ukazuje na konstantno visoke abundancije tijekom tih mjeseci u drugom istraživanom razdoblju.

Istaknuto cvjetanje u veljači zabilježeno je 2004. godine ($6,96 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.2.). Visoke vrijednosti abundancije zabilježene su svibnju i srpnju. Jesensko cvjetanje bilo je slabijeg intenziteta u ovom razdoblju, a najvišu vrijednost dostiglo je 2008. ($2,6 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.2.).

4.5.3 DINOFLAGELATI

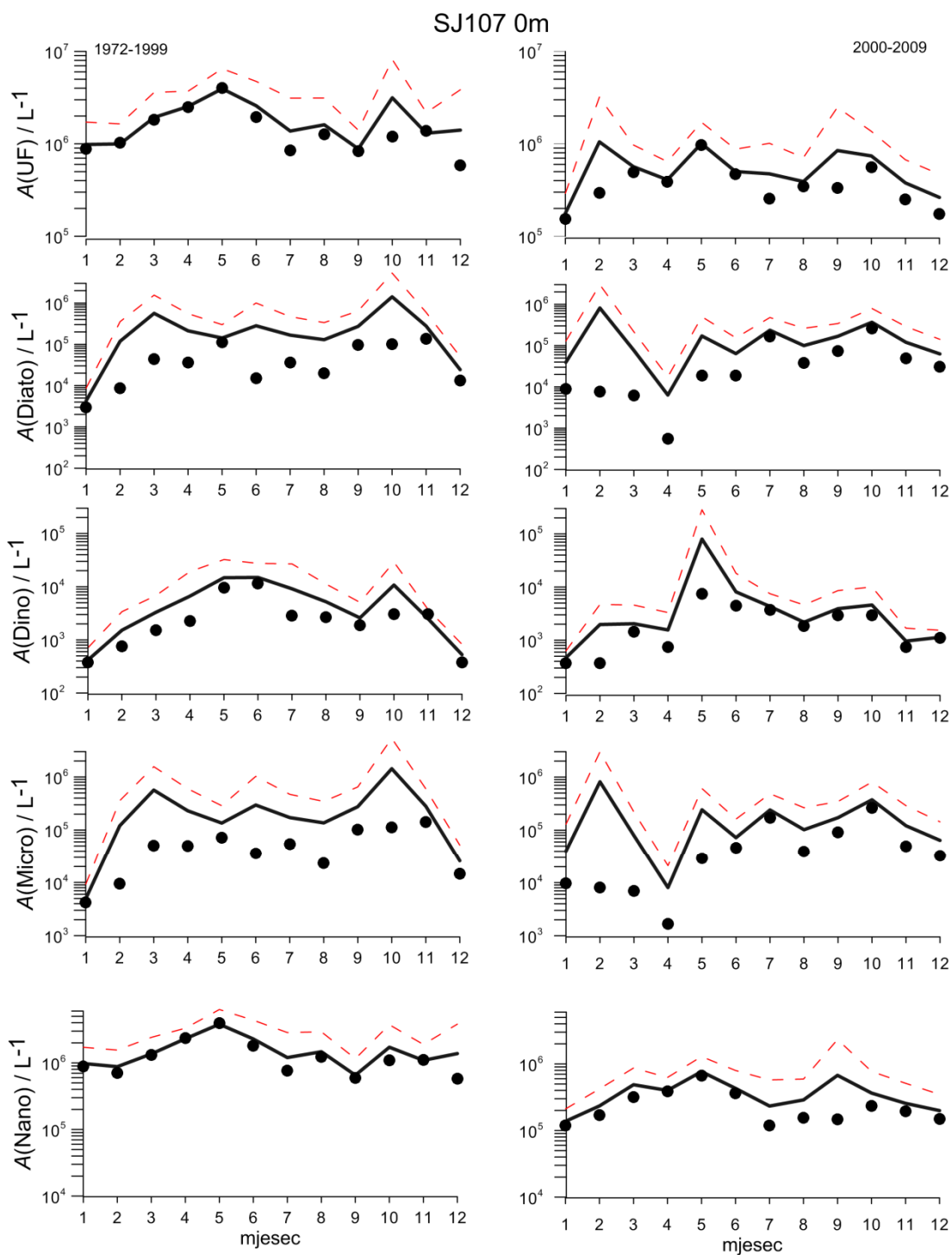
Dinoflagelati su pokazali uobičajeni godišnji ciklus u oba promatrana razdoblja na obje postaje (Slika 4.9. i 4.10.). Na postaji RV001 u prvom razdoblju visoka abundancija dinoflagelata zabilježena je u toplijem dijelu godine, tj. od travnja do kolovoza. Najviša vrijednost zabilježena je u svibnju 1991. ($62,9 \times 10^3$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.1.).

U drugom istraživanom razdoblju, abundancije su bile niže, a najviša vrijednost dostignuta je u lipnju 2000. ($28,1 \times 10^3$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.1.). Medijani su bili slični prosječnim vrijednostima u oba razdoblja.

Na postaji SJ107 dinoflagelati su imali sličan godišnji ciklus (Slika 4.10.). U prvom istraživanom razdoblju najviše godišnje vrijednosti zabilježene su od svibnja do srpnja s najvišom abundancijom u lipnju 1989. ($75,5 \times 10^3$ stanica L^{-1} , Tablica 4.2.). U drugom istraživanom razdoblju dinoflagelati dostižu najviše vrijednosti u svibnju, a vrijednost srednjaka je znatno viša od medijana zbog cvjetanja koje se dogodilo 2002. godine. Dinoflagelati su tada dostigli najvišu vrijednost, u svibnju 2002. zabilježena je izrazito visoka abundancija, 586×10^3 stanica L^{-1} (Tablica 4.2., Slika 4.10.). Zanimljivo je i to što su u drugom istraživanom razdoblju medijani viši za rujan i listopad nego u prvom istraživanom razdoblju.

4.5.4 MIKROPLANKTON

Godišnji ciklusi mikroplanktona i dijatomeja bili su vrlo slični, a najviše abundancije mikroplanktona slijede najviše vrijednosti ili cvjetanja dijatomeja. Na postaji RV001 zabilježena je viša abundancija u prvom razdoblju, a dogodio se i pomak u sezonalnosti cvjetanja. U prvom razdoblju, cvjetanja su bila u ožujku, svibnju i listopadu. Vrijednosti srednjaka bile su više od medijana u sva tri mjeseca što govori da su velika cvjetanja koja su se dogodila utjecala na visoku vrijednost srednjaka. U drugom istraživanom razdoblju cvjetanja su zabilježena u travnju, lipnju i listopadu, a proljetno cvjetanje je gotovo nestalo. Na postaji SJ107 visoka abundancija zabilježena je u ožujku, lipnju i listopadu. Drugo razdoblje je obilježeno nižom ukupnom abundancijom s izraženim jesenskim cvjetanjem.



Slika 4.10. Usporedba godišnje raspodjela površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (stanica L⁻¹), mediana(●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), diatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999. i od 2000-2009. na postaji SJ107.

4.5.5 NANOFITOPLANKTON

Godišnji ciklus nanofitoplanktona promijenio se na obje postaje za dva istraživana razdoblja (Slike 4.9. i 4.10.). Tijekom prvog promatranog razdoblja na postaji RV001 najviše abundancije nanofitoplanktona zabilježene su u razdoblju od travnja do srpnja. Najviša abundancija je iznosila $3,1 \times 10^6$ stanica L^{-1} , a zabilježena je u svibnju 1991. (Tablica 4.1.).

U drugom istraživanom razdoblju abundancije su bile niže. Povišene abundancije zabilježene su u razdoblju od travnja do lipnja, a najviša abundancija dostignuta je u rujnu 2006. ($1,5 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.1.), vrijednosti srednjaka bile su više od mediana.

Na postaji SJ107 zabilježena je slična situacija (Slika 4.10.). U prvom razdoblju najviša godišnja abundancija nanofitoplanktona zabilježena je u svibnju 1988. ($8,56 \times 10^6$ stanica L^{-1} ; Tablica 4.2.). U drugom istraživanom razdoblju abundancije su bile niže. Najveća abundancija zabilježena je u rujnu 2009. ($5,63 \times 10^6$ stanica L^{-1} , Tablica 4.1.).

4.6 TAKSONOMSKI SASTAV ZAJEDNICE

Taksonomija je znanost opisivanja, imenovanja i klasificiranja organizama, te je iznimno važna za procjenu biološke raznolikosti. Od Linnéovog vremena, početkom 18. stoljeća, opisane su stotine tisuća vrsta pod propisanim okvirima međunarodnog nomenklaturnog koda koji je začet sredinom 19. stoljeća. No, klasična taksonomija temeljena na promatranju više nije glavni izvor otkrivanja biološke raznolikosti nego upotpunjena novim spoznajama i novim metodama poprima sasvim drugačije značenje. U okviru opisanih svojiti morskog fitoplanktona dijatomeje, dinoflagelati i haptofiti izgledno dominiraju fitoplanktonskom zajednicom kontinentalnog pojasa, te su odgovorne za sezonska cvjetanja u umjerenim i polarnim morima.

Na postaji RV001, u prvom istraživanom razdoblju određene su 222 fitoplanktonske vrste i 174 vrste u drugom istraživanom razdoblju. Za razliku na postaji SJ107 određeno je 217 vrsta u prvom i 172 vrste u drugom razdoblju (Tablice 4.5 i 4.6.).

U Tablicama 4.5. i 4.6. dat je popis najučestalijih vrsta te njihova usporedba u dva istraživana razdoblja. Najzastupljenija grupa vrsta u oba razdoblja i na obje istraživane postaje bila je grupa *Pseudo-nitzschia delicatissima*, a slijedi je *Cylindrotheca closterium/Nitzschia longissima*, pa *Dactyliosolen fragilissimus*, dok je najučestaliji dinoflagelat bio *Prorocentrum micans*.

Usporedbom vrsta prvog s onima drugog razdoblja uočava se promjena u njihovu sastavu. U Tablicama 4.5. i 4.6. date su najznačajnije vrste s frekvencijom (učestalošću) pojavljivanja (F %), najvišim zabilježenim vrijednostima (max) i srednjom vrijednosti abundancije (avg) u oba istraživana razdoblja. Najznačajnije razlike među razdobljima naznačene su u donjem dijelu Tablice 4.5. za postaju RV001 i Tablice 4.6. za SJ107. Na postaji RV001 najčešće dijatomeje bile su vrste iz grupe *Pseudo-nitzschia*, *Cylindrotheca closterium/Nitzschia longissima*, *Leptocyldrus danicus* i *Cerataulina pelagica* u oba istraživana razdoblja, a u drugom im je čak porasla učestalost pojavljivanja. Najznačajniji dinoflagelati bili su *Gyrodinium* sp. i *Ceratium fusus*, a njihova se učestalost pojavljivanja smanjila u drugom istraživanom razdoblju. Osim vrlo brojnih i učestalih vrsta ili grupa vrsta kao *Pseudo-nitzschia* spp. ili *Rhizosolenia* spp. u navedenim tablicama navedene su i vrste sa znatno nižom abundancijom i učestalošću pojavljivanja, ali sa značajnom razlikom među razdobljima (npr. *Chaetoceros* spp., donji dio Tablica 4.5. i 4.6.).

Tablica 4.5. Dominantne vrste fitoplanktona s frekvencijom pojavljivanja (> od 15 %) u razdobljima 1972-1999. i 2000-2009. na postaji RV001. Podebljana su imena vrsta s izraženijim razlikama među razdobljima.

Razdoblje		1972-1999.			2000-2009.		
		A 10 ³ stanica L ⁻¹			A 10 ³ stanica L ⁻¹		
Vrste		F %	Max	avg	F %	Max	avg
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> grupa	B	62,5	1077	52,2	82,1	427,7	26,6
<i>C. closterium/N. longissima</i> grupa	B	65,8	218,3	7,5	78,3	59,9	4,1
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i> (Bergon) Hasle	B	51,0	599	13,9	53,6	142,1	7,0
<i>Prorocentrum micans</i> Ehren.	D	40,4	33,3	2,1	42,0	7,4	1,1
<i>Rhizosolenia alata</i> (Cleve) Gran	B	40,4	224,4	7,9	50,9	15,5	1,9
<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle	B	30,3	22,2	3,3	33,0	11,1	1,8
<i>Leptocylindrus danicus</i> Cleve	B	29,3	66,6	7,1	55,4	79,9	5,5
<i>Gyrodinium</i> sp.	D	28,8	3,0	0,6	26,8	2,2	0,8
<i>Ceratium fusus</i> (Ehrenberg) Dujardin	D	28,4	2,2	0,6	19,6	1,5	0,6
<i>Guinardia flaccida</i> (Castracane) Peragallo	B	26,0	9,6	1,2	22,3	2,2	0,9
<i>Cerataulina pelagica</i> (Cleve) Hendey	B	25,5	134,7	8,1	54,5	371,5	20,1
<i>Chaetoceros affinis</i> Lauder	B	23,6	63,6	12,4	31,3	222,7	16,9
<i>Ceratium furca</i> (Ehren.) Clap.	D	22,6	40,3	1,6	16,1	3,0	0,7
<i>Hemiaulus hauckii</i> Grunow	B	22,1	11,1	1,1	22,3	3,0	0,9
<i>Syracosphaera pulchra</i> Lohmann	C	19,7	8,1	1,5	14,3	3,7	1,4
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> grupa	B	19,2	1140	34,8	12,5	23,3	3,6
<i>Gymnodinium</i> sp.	D	15,9	8,1	1,2	22,3	3,0	1,0
<i>Skeletonema marinoi</i> Sarno et Zingone	B	14,9	3676	148,1	18,8	170,9	14,0
<i>Chaetoceros curvisetus</i> Cleve	B	14,4	41,3	10,4	10,7	29,6	5,4
vrste s izraženom razlikom							
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller	D	7,2	2,2	0,5	14,3	3,7	0,8
<i>Chaetoceros atlanticus</i> Cleve	B	3,8	23,7	7,8	13,4	10,7	2,9
<i>Rhizosolenia imbricata</i> Brightwell	B	1,9	0,7	0,3	11,6	1,5	0,5
<i>Glenodinium mucronatum</i> Conrad	D	7,2	7,4	0,8	17,0	1,5	0,7
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve	B	6,7	77,0	11,0	17,0	22,2	5,0
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grun.) Mere.	B	13,5	5,2	1,0	40,2	6,7	1,6
<i>Chaetoceros socialis</i> Lauder	B	13,0	5402	314,4	7,1	47,4	8,7

Kratice: F % frekvencija pojavljivanja, Max: maksimum, avg: srednja vrijednost, B: dijatomeje, D: dinoflagelati, C: kokolitoforidi.

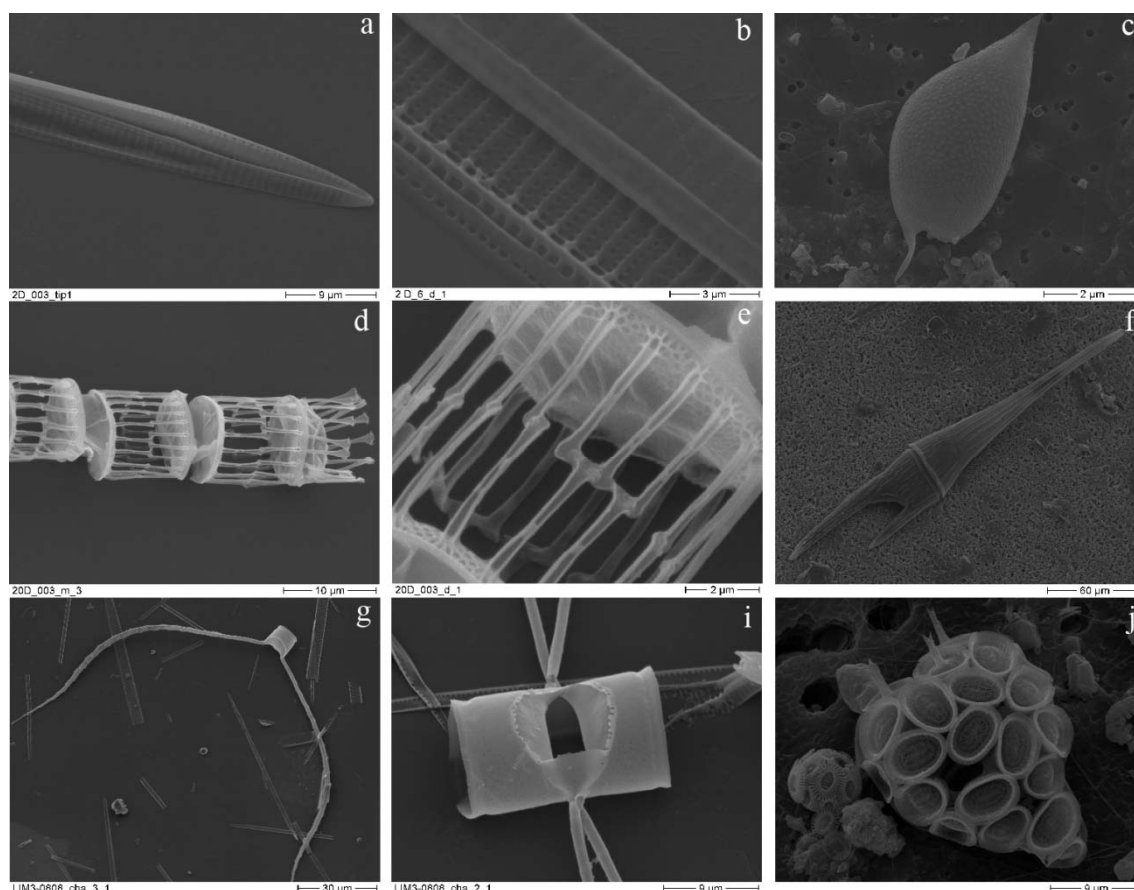
Čak i kratkim pregledom tablice jasno je da dijatomeje prevladavaju u mikrofitoroplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana.

Tablica 4.6. Dominantne vrste fitoplanktona s frekvencijom pojavljivanja (> od 15 %) u razdobljima 1972-1999. i 2000-2009. na postaji SJ107. Podebljana su imena vrsta s izraženijim razlikama među razdobljima.

Razdoblje		1972-1999.			2000-2009.		
		A 10 ³ stanica L ⁻¹			A 10 ³ stanica L ⁻¹		
Vrste		F %	Max	avg	F %	Max	avg
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> grupa	B	56,6	2122	65,2	68,7	378,1	410,9
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i> (Bergon) Hasle	B	53,4	283,4	26,0	61,6	135,4	10,2
<i>C. closterium/N. longissima</i> grupa	B	49,6	201,3	10,4	57,2	79,2	6,2
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	D	46,1	18,5	2,6	29,5	8,9	1,2
<i>Rhizosolenia alata</i> (Cleve) Gran	B	42,9	159,7	7,4	50,0	47,4	2,5
<i>Ceratium fusus</i> (Ehren.) Dujardin	D	39,0	7,4	0,9	20,5	3,0	1,0
<i>Ceratium furca</i> (Ehren.) Cla. Lach	D	35,5	11,1	1,2	20,5	3,0	0,8
<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle	B	33,7	93,2	5,9	36,6	19,2	3,0
<i>Gyrodinium</i> sp.	D	30,7	9,6	1,2	25,9	5,2	1,0
<i>Leptocylindrus danicus</i> Cleve	B	28,9	300,4	21,4	40,2	53,3	8,3
<i>Guinardia flaccida</i> (Castracane) Peragallo	B	27,6	20,4	1,8	25,0	3,0	0,9
<i>Cerataulina pelagica</i> (Cleve) Hendey	B	25,4	1020	29,1	58,9	985,7	36,8
<i>Syracosphaera pulchra</i> Lohmann	B	25,0	81,4	4,6	20,5	4,4	1,2
<i>Chaetoceros affinis</i> Lauder	B	23,7	330,0	22,6	36,6	192,4	13,8
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> grupa	B	22,8	1804,1	46,4	12,5	611,2	80,9
<i>Hemiaulus hauckii</i> Grunow	B	22,4	8,5	1,2	26,8	110,3	4,6
<i>Gymnodinium</i> sp.	D	19,7	41,4	3,0	16,9	3,7	1,7
<i>Prorocentrum compressum</i> (Bailey)	D	18,4	6,7	1,0	2,7	0,7	0,5
<i>Chaetoceros curvisetus</i> Cleve	B	16,7	284,2	28,3	15,2	41,4	5,7
<i>Glenodinium mucronatum</i> Conrad	D	16,7	5,2	1,1	17,9	3,7	0,9
<i>Protoperidinium steinii</i> (Jörgen.) Balech	D	15,8	2,3	0,6	8,0	1,5	0,8
<i>Skeletonema marinoi</i> Sarno Zingone	B	14,5	3346	290,5	11,6	6875	604,1
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grun.) Mere.	B	14,5	219,0	9,9	41,1	12,6	2,3
vrste s izraženom razlikom							
<i>Protoperidinium pyriforme</i> (Paulsen) B	D	12,3	2,9	0,6	2,7	0,7	0,6
<i>Proboscia alata</i> (Brightwell) Sundst	B	10,5	24,4	1,9	1,8	0,7	0,6
<i>Protoperidinium diabolus</i> (Cleve) Bal	D	13,6	4,1	0,9	5,4	1,5	0,8
<i>Chaetoceros compressus</i> Lauder	B	8,3	205,0	46,8	17,0	529,1	56,6
<i>Rhizosolenia imbricata</i> Brightwell	B	0,9	0,4	0,3	9,8	1,3	0,6
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (Castr.) Roun	B	10,9	210,9	18,3	22,3	384,8	22,9
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller	D	4,4	2,2	1,0	16,1	5,2	1,5
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve	B	13,6	22,9	5,9	29,5	24,4	5,3

Kratice: F %: frekvencija pojavljivanja, Max: maksimum, avg: srednja vrijednost, B: dijatomeje, D: dinoflagelati, C: kokolitoforidi.

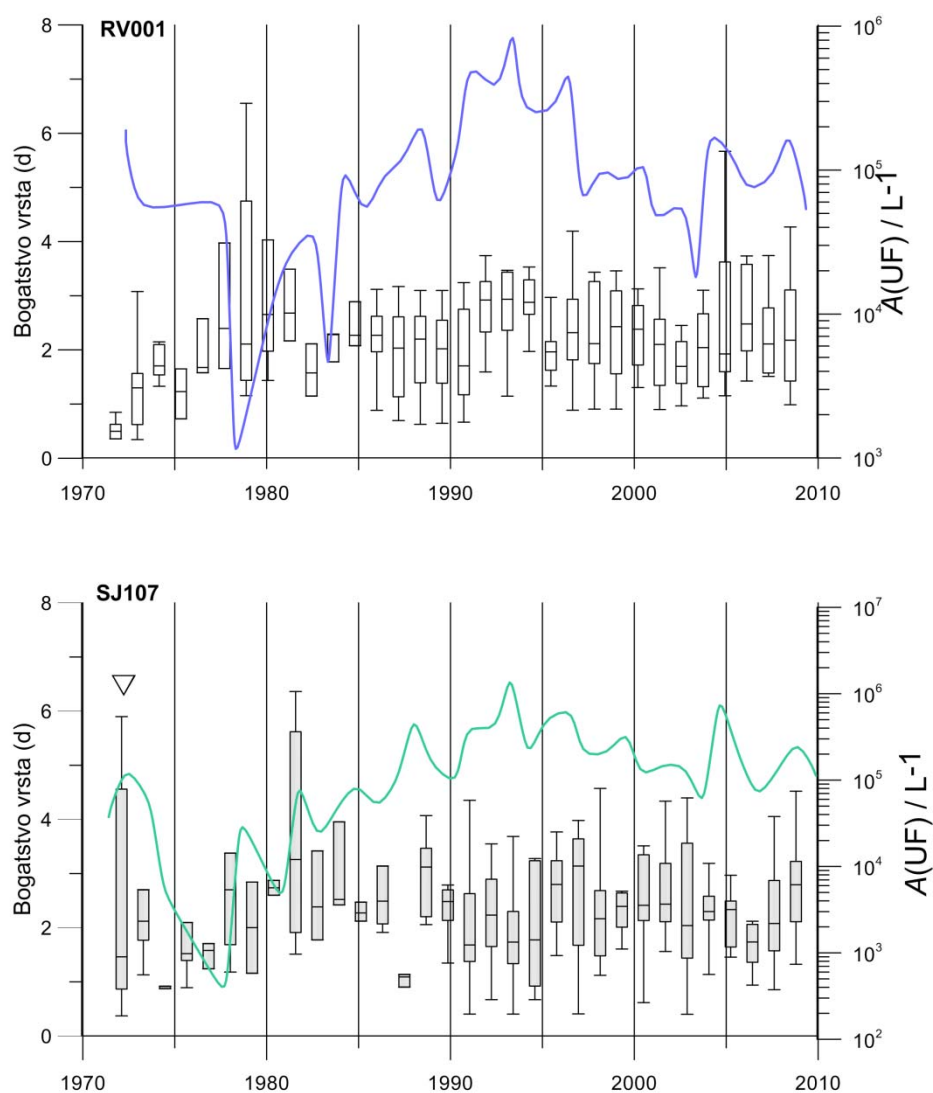
Postoje i vrste čije su prosječne abundancije i učestalost pojavljivanja porasle od 2000-2009., a to su: *Asterionellopsis glacialis*, *Chaetoceros compressus* i *Cerataulina pelagica*, i to na obje postaje. Rezultati za postaju SJ107 vrlo su slični onima s RV001. Dinoflagelati *P. micans* i *Ceratium* spp. bili su brojniji te su se učestalije pojavljivali na postaji SJ107 u odnosu na RV001, a njihova se abundancija dodatno smanjila u drugom istraživanom razdoblju. Na postaji SJ107 zabilježeno je više vrsta dinoflagelata nego na RV001. Za neke vrste postoje značajne razlike među postajama. Npr. u drugom istraživanom razdoblju vrsta *Skeletonema marinoi* češće se pojavljivala na postaji RV001 iako su joj prosječne vrijednosti bile niže od prethodnog razdoblja. Učestalost pojavljivanja i abundancija te vrste smanjile su se u drugom istraživanom razdoblju na postaji SJ107, iako su prosječne vrijednosti bile znatno više (gotovo dvostruko) zbog izuzetno velike abundancije ove vrste zabilježene u veljači 2004.



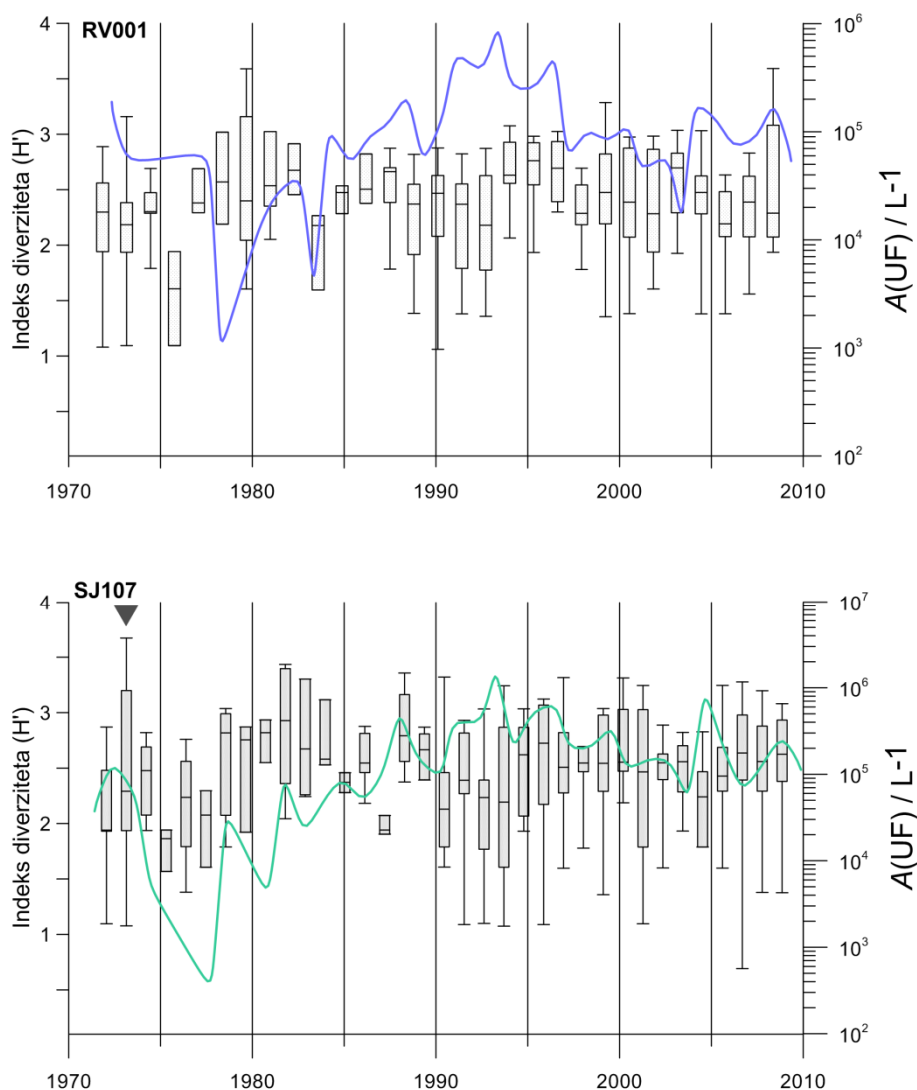
Slika 4.11. Neke od dominantnih vrsta fitoplanktona u sjevernom Jadranu. a) *Pseudo-nitzschia* sp., b) *P. pungens*, c) *Prorocentrum triestinum*, d-e) *Skeletonema marinoi*, f) *Ceratium furca*, g-i) *Chaetoceros affinis*, j) *Syracosphaera pulchra* i *Emiliana huxleyi*.

4.7 RAZNOLIKOST I BOGATSTVO VRSTA

Struktura fitoplanktonske zajednice opisana je ukupnim brojem vrsta, tj. Margalefovom indeksom (d) koji predstavlja bogatstvo vrsta kao funkciju ukupnog broja jedinki (N) i ukupnog broja vrsta (S) i indeksom raznolikosti, tj. Shannon-Wienerovim indeksom. Uspoređeni su godišnji i mjesečni indeksi. Godišnji indeks nije se značajnije mijenjao u čitavom istraživanom razdoblju (Slika 4.12. i 4.13.).

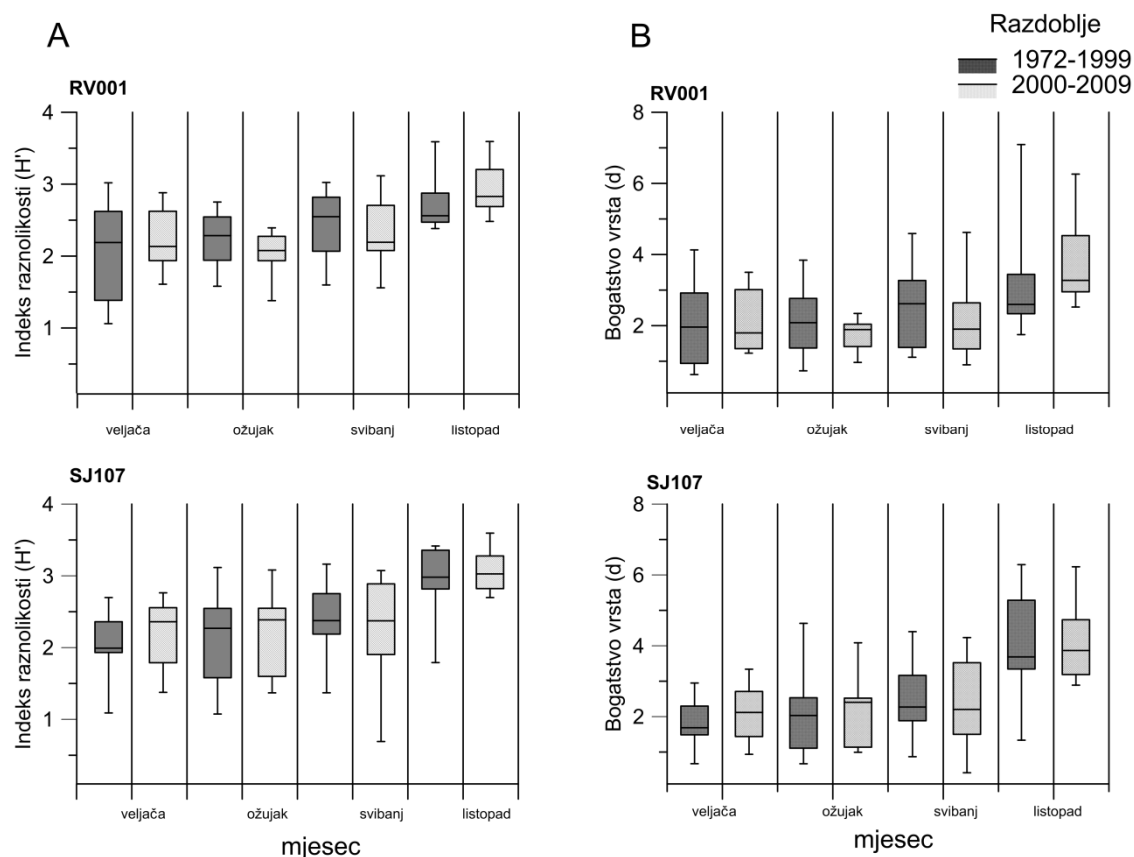


Slika 4.12. Box plot raspodjele Margalefovog indeksa (d) i prosječne abundancije (stanica L^{-1}) ukupnog fitoplanktona (UF) za razdoblje 1972-2010. na postajama RV001 (—) i SJ107(—).



Slika 4.13. Raspodjela indeksa raznolikosti (H') i prosječne abundancije (stanica L^{-1}) ukupnog fitoplanktona (UF) za razdoblje 1972-2010. na postajama RV001(—) i SJ107(—).

U nekim je godinama promjenjivost indeksa bila veća što je povezano i s učestalošću uzorkovanja, ali nisu primijećene nikakve značajnije razlike između razdoblja. Najveća promjenjivost indeksa zabilježena je 1973. (Slika 4.13.) kao rezultat vrlo učestalog uzorkovanja (svaka 2 tjedna).



Slika 4.14. Mjesečne vrijednosti indeksa raznolikosti (H') i bogatstva vrsta (d) za dva razdoblja 1972-1999. i 2000-2009. na postajama RV001 i SJ107.

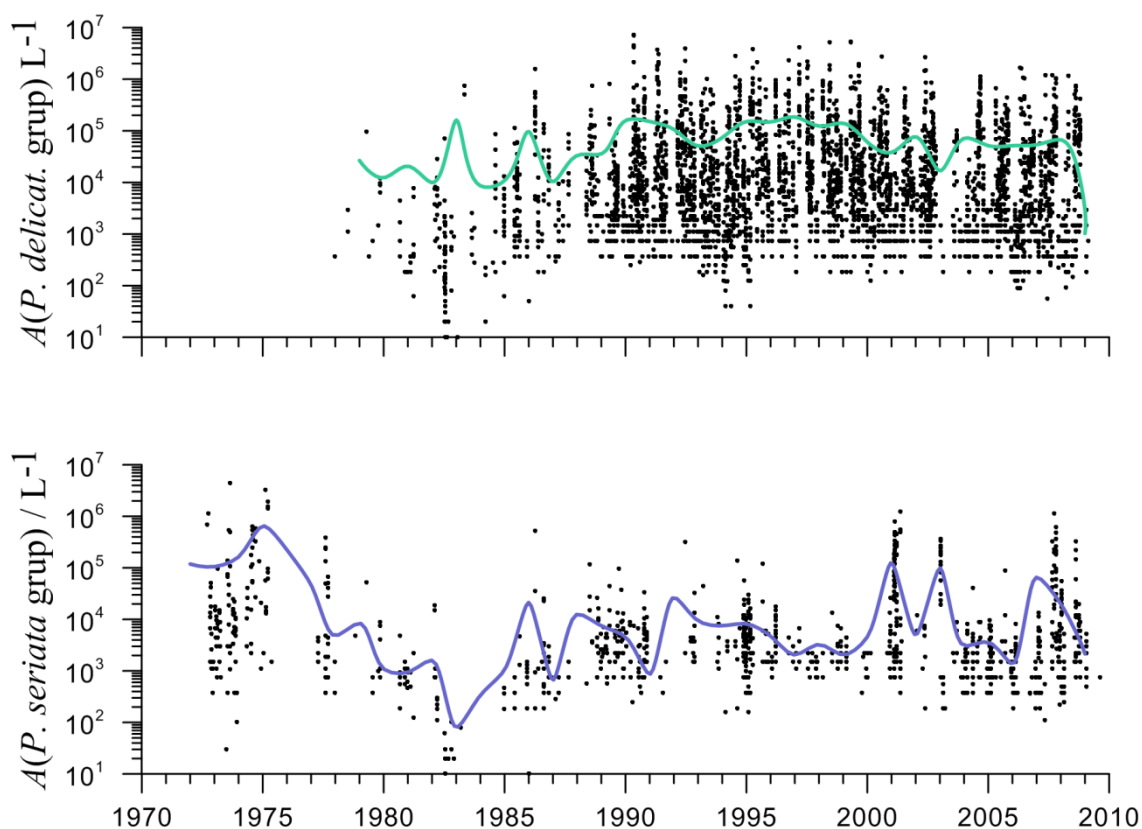
Srednja mjesečna vrijednost indeksa raznolikosti i bogatstva vrsta izračunate su za mjesec kada su zabilježena značajnija cvjetanja (veljača, ožujak, svibanj i listopad). Najviše vrijednosti indeksa raznolikosti i bogatstva vrsta zabilježene su tijekom jesenskog cvjetanja kada su zajednicom dominirale dijatomeje i to iz porodice Chaetoceracee.

4.8 EKOLOGIJA I DINAMIKA CVJETANJA RODA

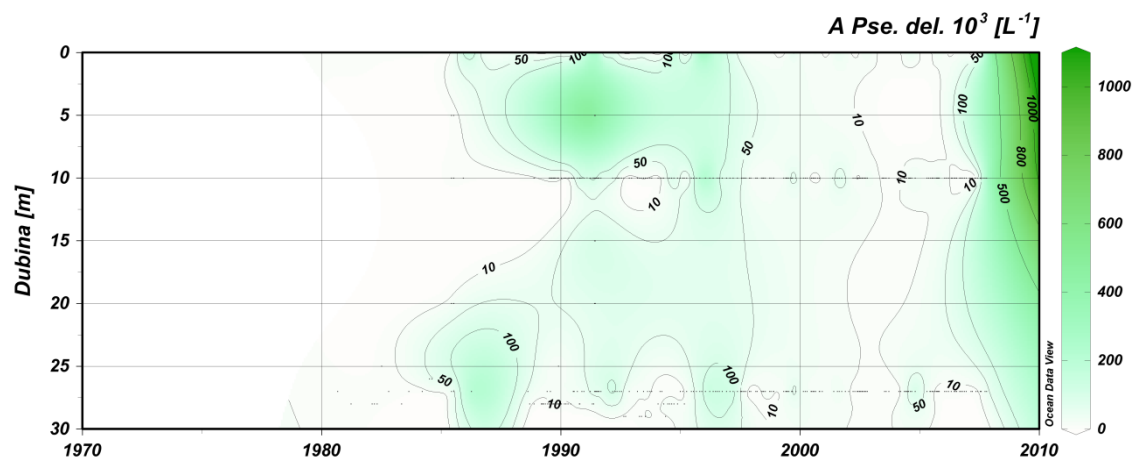
PSEUDO-NITZSCHIA U SJEVERNOM JADRANU

4.8.1 VREMENSKA RASPODJELA

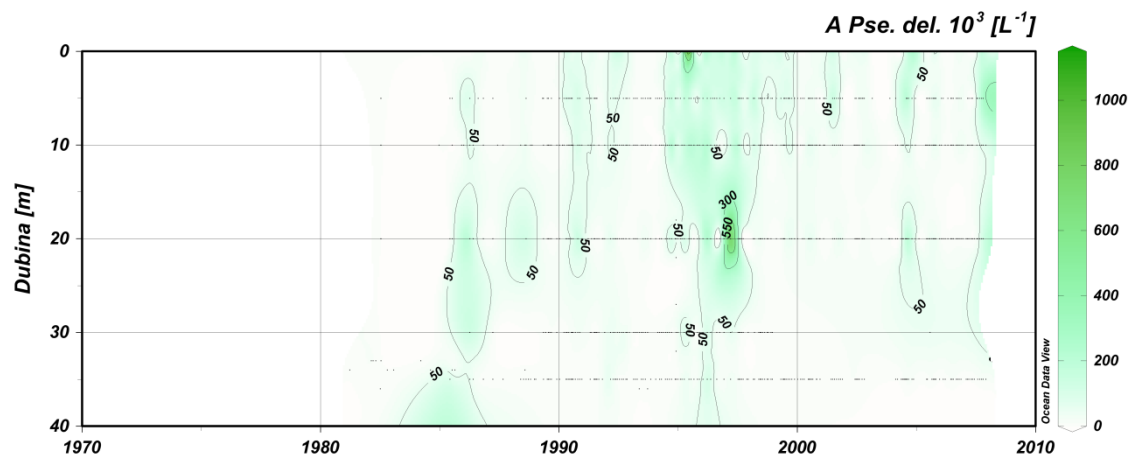
Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* bile su prisutne tijekom čitavog istraživanog razdoblja, a često su i najbrojniji i najučestaliji rod dijatomeja u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana. Rod *Pseudo-nitzschia* vrlo je jednostavno prepoznati pri rutinskoj obradi uzoraka na svjetlosnom mikroskopu, te možemo ugrubo izmjeriti širinu i dužinu stanica u lančanim kolonijama. Na svjetlosnom mikroskopu pri rutinskom pregledu uzoraka možemo razlikovati dvije grupe vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*, **grupa *seriata*** (širina valve je veća od 3 μm) i **grupa *delicatissima*** (širina valve je manja od 3 μm), no za točnu identifikaciju vrsta potrebno je detaljno proučiti morfološka obilježja silicijeve ljušturice elektronskim mikroskopom.



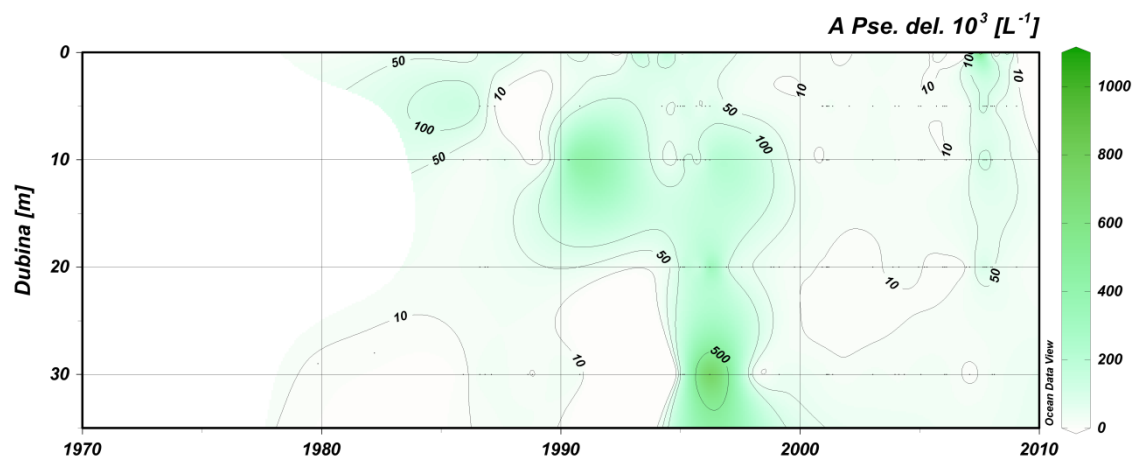
Slika 4.15. Raspodjela abundancije (stanica L^{-1}) po godinama (●) i klizni srednjak grupa *Pseudo-nitzschia delicatissima* (—) i *P. seriata* (—) na postajama RV001, SJ107, SJ101 od 1972-2009.



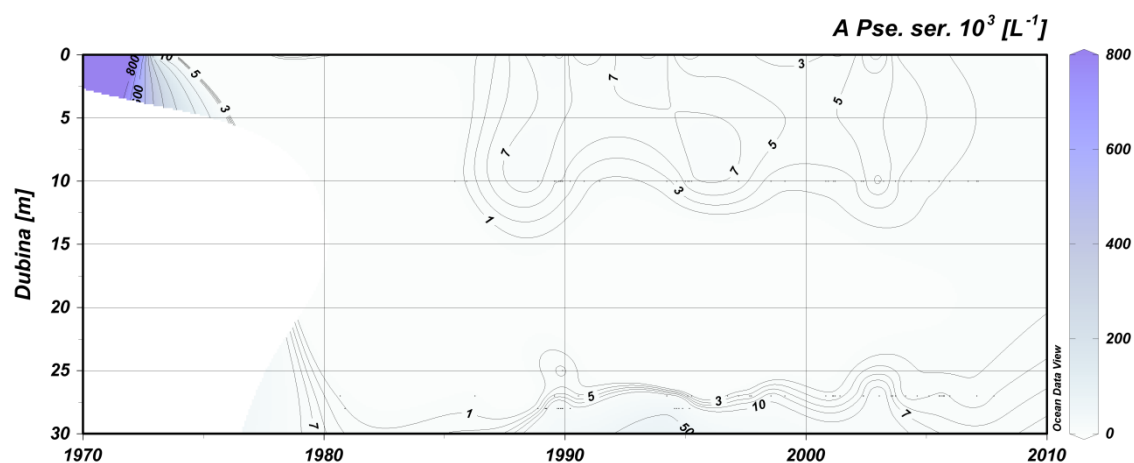
Slika 4.16. Raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na postaji RV001 (1972-2009.)



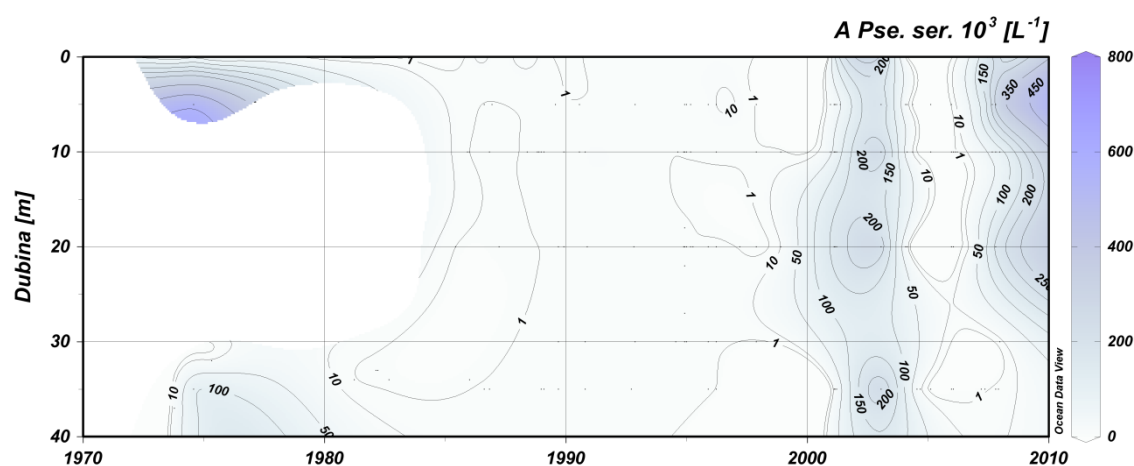
Slika 4.17. Raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na postaji SJ107 (1972-2009.)



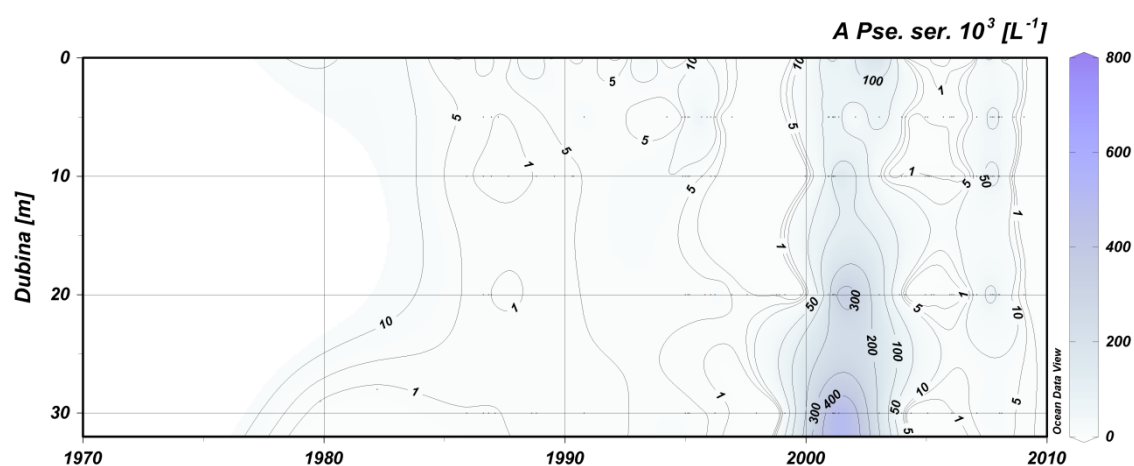
Slika 4.18. Raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na postaji SJ101 (1972-2009.)



Slika 4.19. Raspodjela abundancije grupe *Pseudo-nitzschia seriata* (stanica L^{-1}) na postaji RV001 (1972-2009.).



Slika 4.20. Raspodjela abundancije grupe *Pseudo-nitzschia seriata* (stanica L^{-1}) na postaji SJ107 (1972-2009.).



Slika 4.21. Raspodjela abundancije grupe *Pseudo-nitzschia seriata* (stanica L^{-1}) na postaji RV001 (1972-2009.).

U istraživanom razdoblju promjenjivost unutar grupa vrsta roda *Pseudo-nitzschia* bila je značajna (Slika 4.15.).

Grupa *Pseudo-nitzschia delicatissima* prvi se put pojavila 1978. godine prošlog stoljeća i otad joj učestalost pojavljivanja raste. Posljednjih godina je vrlo česta i dostiže visoke abundancije. Na primjer, *P. delicatissima* grupa u drugom istraživanom razdoblju od 2000-2009. ima učestalost pojavljivanja od 68-82 % na postajama RV001 i SJ107.

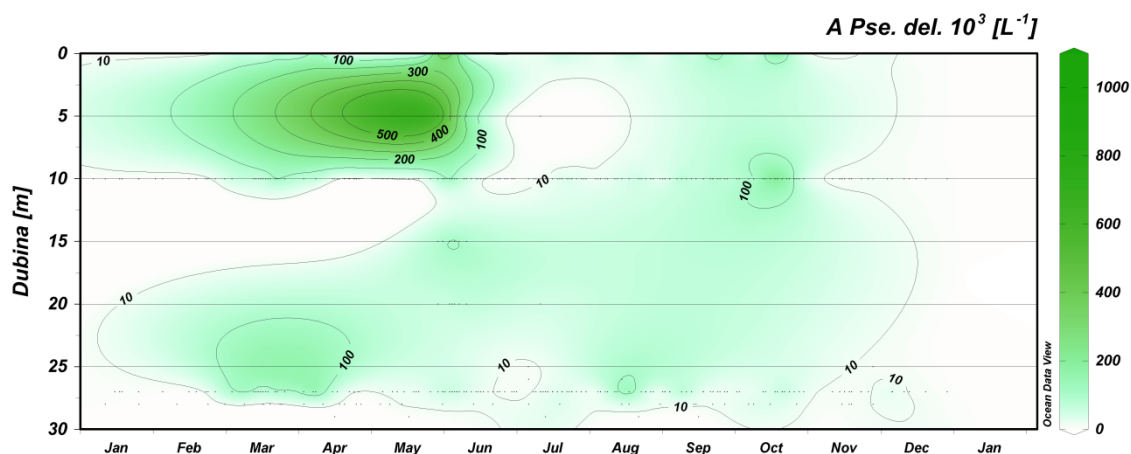
Vrste iz grupe *P. seriata* pokazuju značajno manju brojnost i učestalost u odnosu na grupu *P. delicatissima*. U 1970-ima učestalost pojavljivanja kretala se od 36-89 % i od tada postupno opada, te u posljednje vrijeme učestalost pojavljivanja nije veća od 12,5 %. Na postaji RV001 grupa *P. delicatissima* pojavljuje se sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća, a dostiže svoju najveću abundanciju 2009. pred kraj istraživanog razdoblja (Slika 4.16.).

Grupa *P. delicatissima* je prisutna sa sličnim abundancijama i na postajama SJ107 (Slika 4.17.) i SJ101 (Slika 4.18.), gdje dostiže svoju najveću abundanciju krajem 1990-tih.

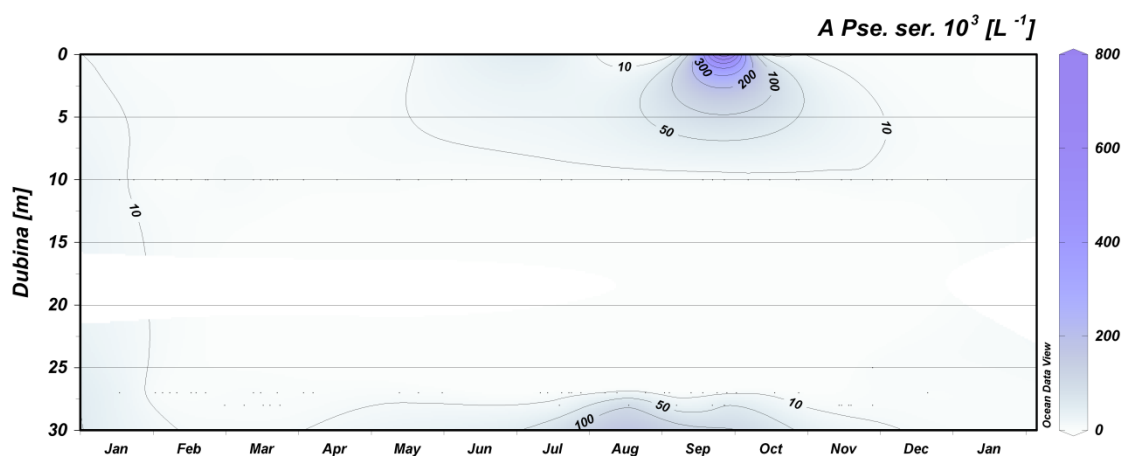
Za grupu *P. seriata* na postaji RV001 najviša abundancija zabilježena je početkom 1970-tih (Slika 4.19.). Grupa *P. seriata* bila je prisutna tijekom čitavog istraživanog razdoblja, ali sa značajno nižim abundancijama i učestalošću pojavljivanja. Na postajama SJ107 i SJ101 grupa *P. seriata* je prisutna sa sličnim abundancijama i sličnom vremenskom raspodjelom. Na postaji SJ107 (Slika 4.20.) njena najveća abundancija zabilježena je sredinom 1970-tih, te je prisutna s vrlo niskom abundancijom do 2000. Povišene abundancije ponovno su zabilježene 2003. godine, a najviše vrijednosti ova grupa je dostigla pred kraj istraživanog razdoblja, 2009. na postaji SJ107. Najviša abundancija na postaji SJ101 (Slika 4.21.), za grupu *P. seriata* zabilježena je 2003., a kasnije ona ostaje niska do kraja istraživanog razdoblja.

4.8.2 SEZONSKA RASPODJELA

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* prisutne su tijekom čitave godine na svim postajama, a često dostižu visoku abundanciju. Na postaji RV001 grupa *P. delicatissima* dostiže svoju najvišu abundanciju u travnju i svibnju, dok jesenske vrijednosti nisu tako izražene (Slika 4.22.). Grupa *P. delicatissima* je prisutna s niskom abundancijom kroz čitavu godinu što doprinosi povećanju učestalosti pojavljivanja ove grupe posljednjih godina. Grupa *P. seriata* pojavljuje se s većom abundancijom u jesenskim mjesecima u površinskom sloju (rujan, listopad, Slika 4.23.). Također, zabilježene su povišene vrijednosti u pridnom sloju, te krajem ljeta kad je vodeni stupac raslojen.



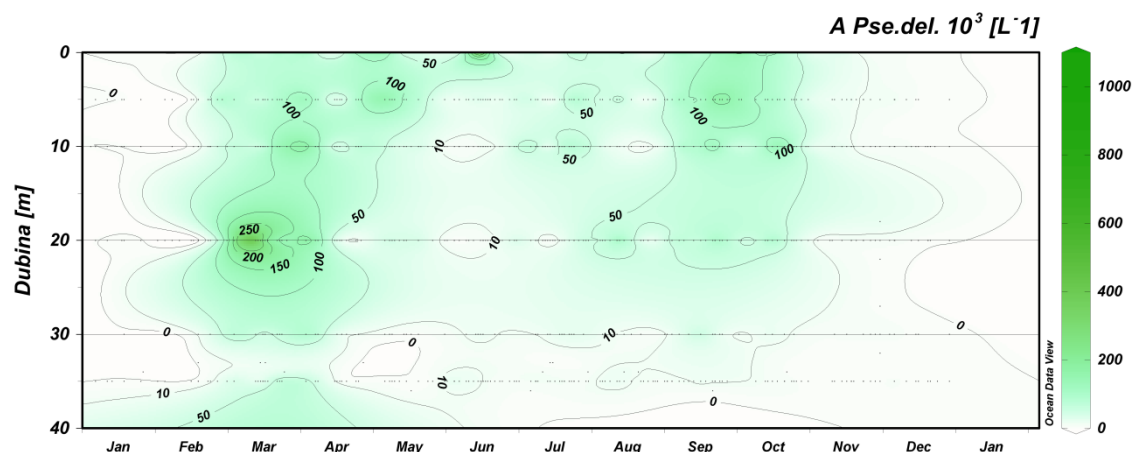
Slika 4.22. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L¹) na postaji RV001.



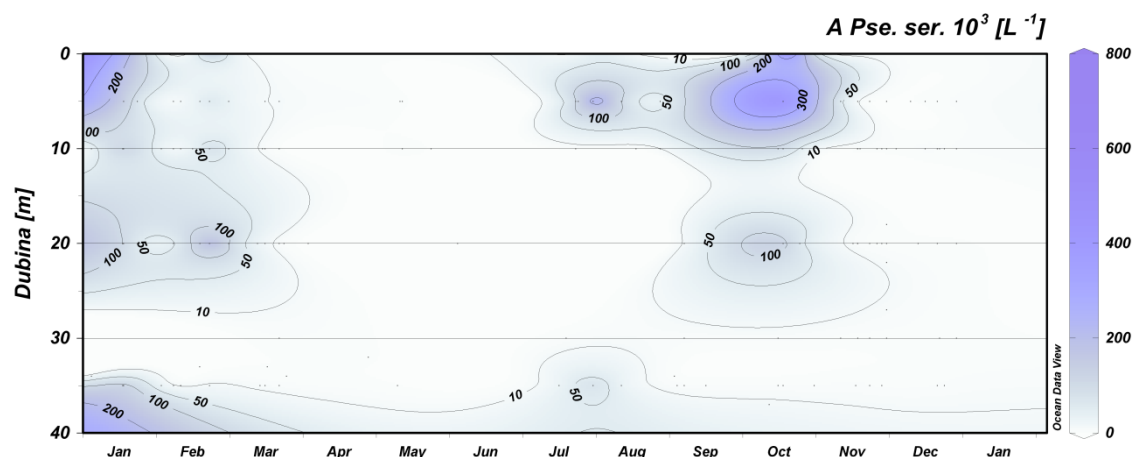
Slika 4.23. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. seriata* (stanica L¹) na postaji RV001.

Na postaji SJ107 grupa *P. delicatissima* dostiže najveću abundanciju u proljeće (ožujak) i u jesen (rujan, listopad, Slika 4.24.). Slično kao na postaji RV001 zabilježene su niske

abundancije grupe *P. delicatissima* kroz čitavu godinu i to je ono što doprinosi povećanju učestalosti pojavljivanja ove grupe posljednjih godina. Za razliku, veće abundancije grupe *P. seriata* zabilježene su u zimskim mjesecima (siječanj, veljača) i u jesen (rujan, listopad, Slika 4.25.). Zabilježene su i povišene vrijednosti u pridnom sloju tijekom ljetnih mjeseci.

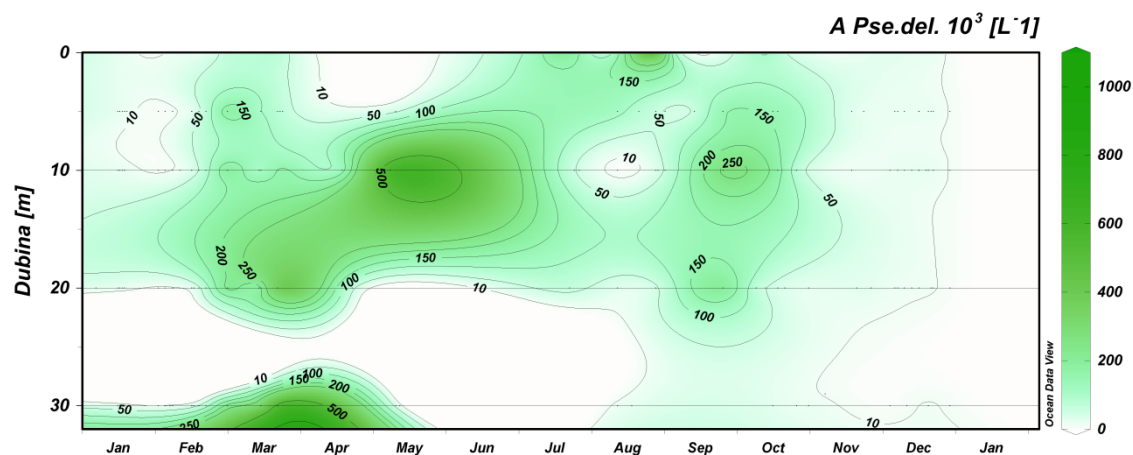


Slika 4.24. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na postaji SJ107.

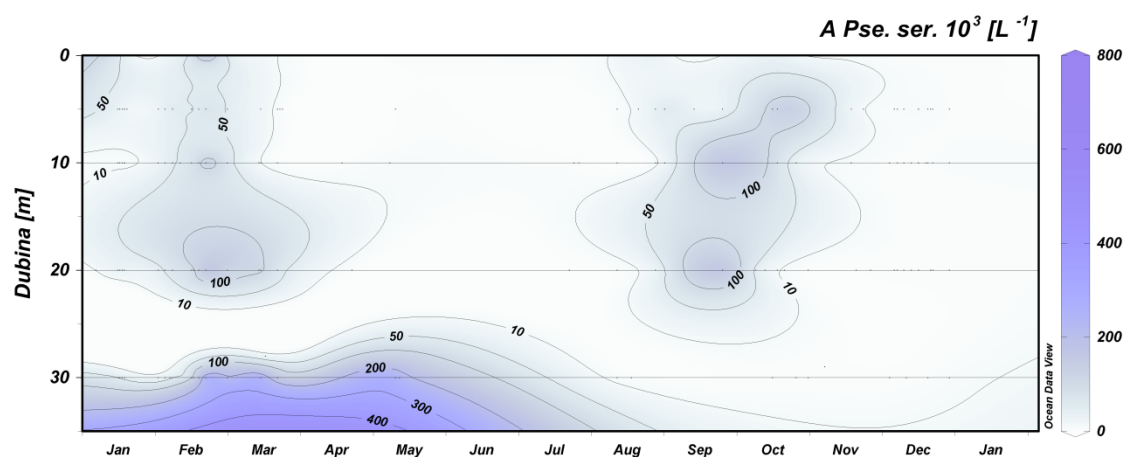


Slika 4.25. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. seriata* (stanica L^{-1}) na postaji SJ107.

Sezonska raspodjela abundancija grupe *P. delicatissima* na postaji SJ101 ima dva izražena povećanja, proljetno i jesensko. Najveće su abundancije od ožujka do lipnja i tijekom jeseni u rujnu i listopadu (Slika 4.26.) Sezonska raspodjela abundancija grupe *P. seriata* također ima dva povećanja: prvo započinje već u zimskim mjesecima (siječanj-veljača), a drugo je također u jesen (rujan, listopad, Slika 4.27.).



Slika 4.26. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L⁻¹) na postaji SJ101.



Slika 4.27. Srednja godišnja raspodjela abundancije grupe *P. seriata* (stanica L⁻¹) na postaji SJ101.

4.9 EKOLOŠKE I TAKSONOMSKE ZNAČAJKE VRSTA RODA

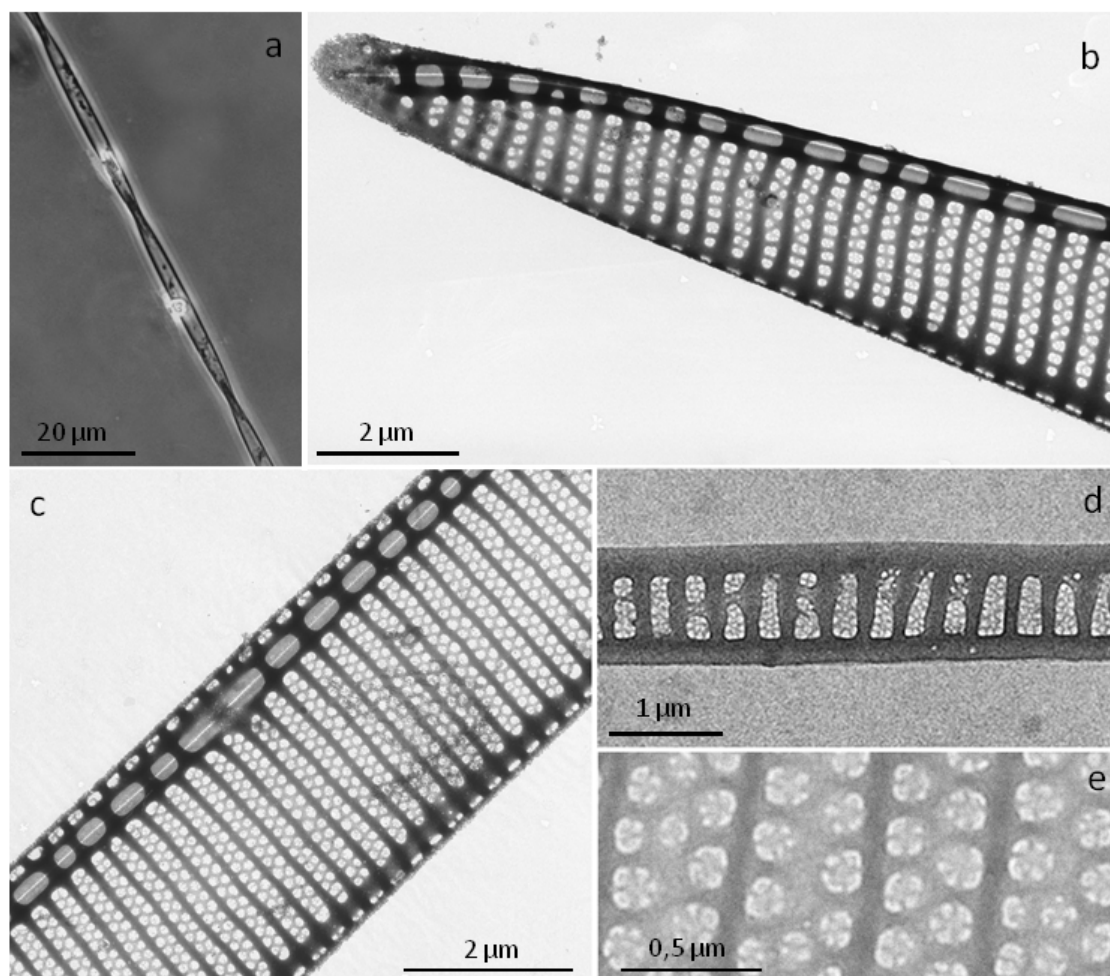
PSEUDO-NITZSCHIA

Vrste su osnovne prirodne jedinice i njihovo pravilno opisivanje, uz razumijevanje njihove ekologije, biogeografije, evolucije i specijacije nužan je preduvjet za procjenu biološke raznolikosti.

Specifične vrste roda *Pseudo-nitzschia* mogu biti određene samo na osnovi detaljnijih morfoloških obilježja, tj. broja strija i fibula, strukture areola, postojanju ili izostanku središnje pore, obliku, dužini i širini valve. Većinu morfoloških obilježja možemo prepoznati samo elektronskim mikroskopom. Taksonomija ovih dijatomeja temelji se na morfološkim karakteristikama i detaljima silicijeve ljušturice.

4.9.1 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Vrsta *P. fraudulenta* određena je za vrijeme cvjetanja u veljači 2008. godine zajedno s vrstom *P. pungens* u Limskom kanalu i najviše su dostignute abundancije bile do 10^5 stanica L^{-1} . Detaljnim pregledom i mjerenjem očišćenih frustula na elektronskom mikroskopu utvrđene su *P. fraudulenta* i *P. pungens*, obje vrste prema širini valve svrstavamo u grupu vrsta *P. seriata*. Kolonije vrste *P. fraudulenta* bile su linearanog oblika s kratkim preklapanjem između stanica 14-17 % (Slika 4.28.). Valve su bile lanceolantnog oblika sa šiljastim krajevima i velikom središnjom porom. Dužina stanica se kretala od 71 do 110 μm , a širina valve od 3,8 do 7,0 μm (Slika 4.28. a-c).



Slika 4.28. *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. a) mikrografija kolonije na svjetlosnom, i b-e) elektronskom mikroskopu (TEM). b) vrh valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama, c) sredina stanice s središnjom porom, d) pojas i e) struktura aureola. Preuzeto iz Ljubešić i sur. (2011).

Broj strija bio je od 17 do 30 u 10 μm , a broj fibula od 16 do 30 u 10 μm . Strije su perforirane s dva reda pora (6-7 u 1 μm). Aureole su perforirane s tri četiri nepravilna otvora (Slika 4.28. e).

Usporedba morfoloških karakteristika iz literature s detaljnim morfološkim mjerenjima za vrstu *P. fraudulentu* iz sjevernog Jadrana nađenih za vrijeme cvjetanja 2008. i mjerenjima iz kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana data je u Tablici 4.7.

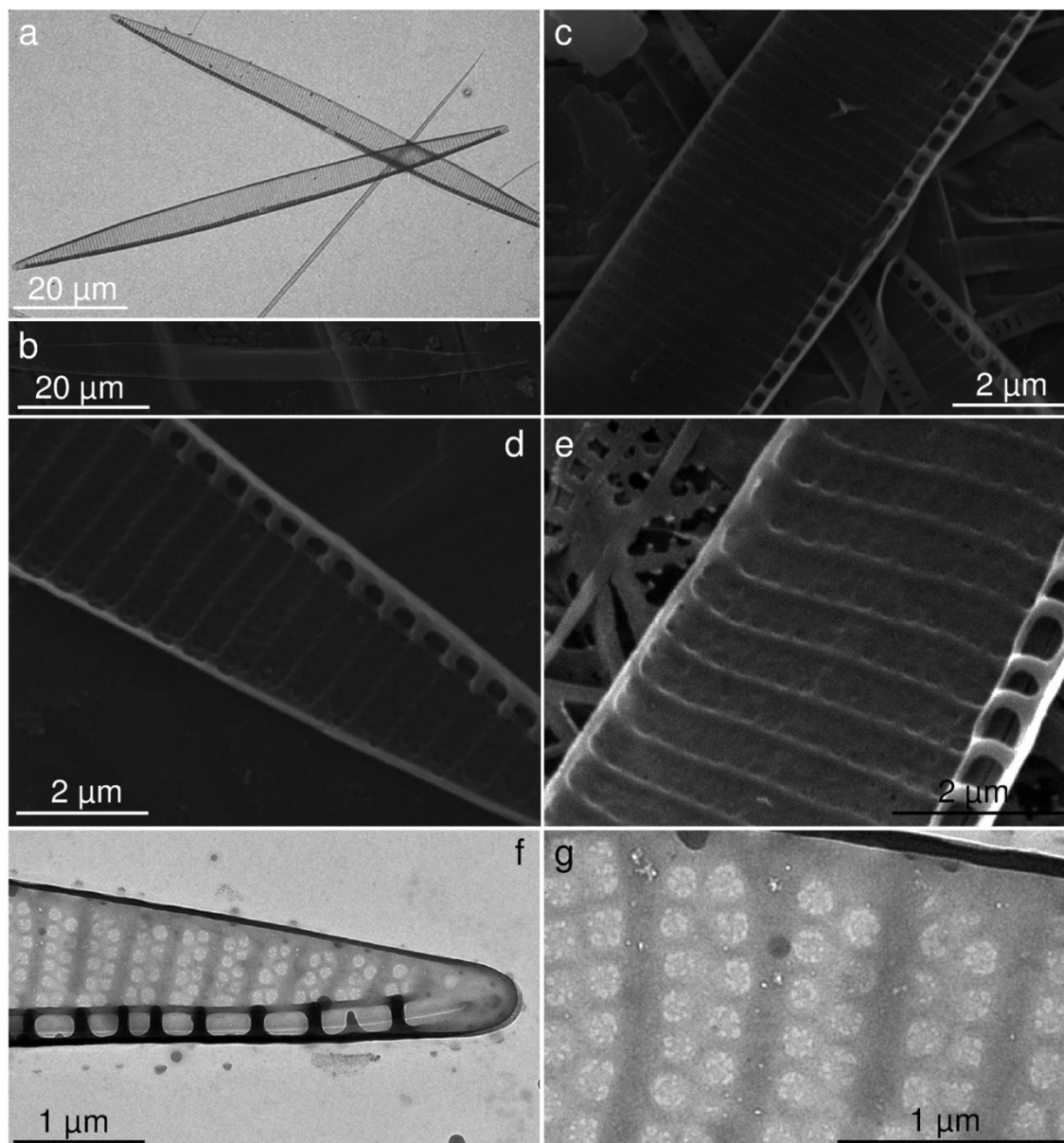
Tablica 4.7. Morfološka mjerenja vrste *P. fraudulentu* objavljena u literaturi i onih iz sjevernog Jadrana 2009. i 2011. godine. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

Dužina/ μm		Širina/ μm		Fibule/ 10 μm		Strije/ 10 μm		Pore/ 1 μm		R./ p.	literatura
Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
mjerenja iz literature											
64	111	4,5	6,5	12	24	18	24	5	6	2-3	Hasle, 1965
50	119	5,6	10	18	19	37	39	5	5	2-3	Rivera, 1985
60	100	4,0	8,0	20	24	20	24	5	6	2-3	Hallegraeff, 1994
73	117	5,0	6,0	19	23	19	23	4	5	2-3	Hasle i sur., 1996
60	162	4,4	6,8	19	21	17	24	-	-	-	Villac, 1996 (field)
85	85	6,0	6,0	18	19	18	19	5	5	2-3	Villac, 1996 (cultures)
63	69	3,0	4,5	15	17	14	15	-	-	2	Hernández-Becerrill, 1998
-	-	4,0	4,2	23	26	23	26	5	6	-	Skov i sur., 1999
72	88	5,7	7,2	18	20	17	20	-	6	3	Ferrario i sur., 2002
65	164	4,0	8,0	21	25	21	25	4,5	7	3	Cusack i sur., 2004
93	98	5,0	6,0	20	24	21	23	5	6		Kaczmarska i sur., 2005
68	110	4,6	6,7	17	22	19	23	5	6		Srednja vrijednost
mjerenja iz sjevernog Jadrana											
71	101	4,0	7,0	18	30	19	28	6	7	2-3	Ljubešić i sur. 2011
92,5	110	4,4	5,8	16	24	17	24	5	6	1-3	CIM 1.1.1.1.
		3,8	4,4	18	26	20	30	6	7	2-3	CIM 2.1.1.1.
81	105	4,11	5,7	17	26	18	27	6	7		Srednja vrijednost

Kratice: R/p: broj redova pora unutar strija; CIM interna numeracija kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana

4.9.2 *PSEUDO-NITZSCHIA SUBFRAUDULENTA*

Kolonije su bile linearanog oblika s kratkim preklapanjem između stanica od 17-25 %. Valve su linearnog oblika sa šiljastim krajevima i središnjom porom (Slika 4.29.). Dužina stanica kretala se od 71,0 do 100,9 μm , a širina valve od 3,1 do 5,8 μm (Slika 4.29. a-g).



Slika 4.29. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta*. Mikrografije frustula na transmisijском (a), f-g (TEM) i pretražnom elektrоnskom mikroskopu (b-e; SEM). a) valva u cijelosti c) sredina stanice s središnjom porom, fibulama i strijama, d) vrh valve, e) struktura pora, f) vrh valve s vidljivom rafom i g) struktura aureola.

Broj strija bio je od 20 do 25 u 10 μm , a broj fibula od 15 do 25 u 10 μm . Strije su perforirane s dva do tri reda pora (4-6 u 1 μm). Aureole su perforirane s tri do četiri nepravilna otvora (Slika 4.29. g).

Usporedba morfoloških karakteristika *P. subfraudulentu* iz kultura s morfološkim mjerenjima iz literature (Bosak i sur., 2010; Moschandreou i Nikolaidis, 2010) dana je u Tablici 4.8. Posebno su istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime najviši broj fibula u uzorcima iz sjevernog Jadrana bio je 25 u 10 μm .

Unatoč mjerenjima domoična kiselina nije zabilježena u kulturama vrste *P. subfraudulenta* iz sjevernog Jadrana.

Tablica 4.8. Morfološka mjerenja vrste *P. subfraudulenta* iz kultura iz sjevernog Jadrana i ona objavljena u literaturi 2010. godine. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

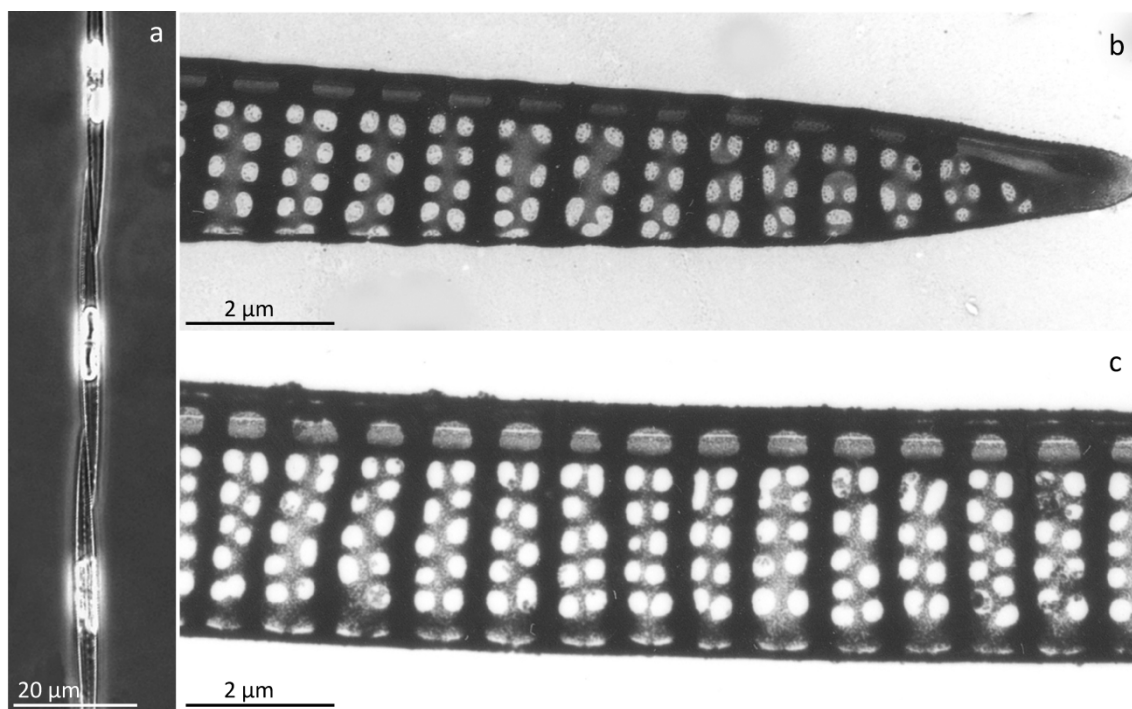
	Dužina/ μm	Širina/ μm	Fibule/10 μm	Strije/10 μm	Pore/1 μm
CIM 512					
min	71,0	3,1	15	20	4
max	78,0	5,8	25	25	6
sd	1,9	0,8	2,6	1,7	0,7
avg	74,4	4,7	18,9	21,5	4,9
Moschandreou i sur., 2010					
min	70	4,3	15	24	4
max	78	5,0	19	27	6
sd	3,0	0,2	1,3	0,9	0,6
avg	74,0	4,7	16,7	25,7	5,2
Bosak i sur., 2010					
min	85,6	4,3	13	22	6
max	195,6	6,7	17	28	7

Kratice: CIM interna numeracija kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana

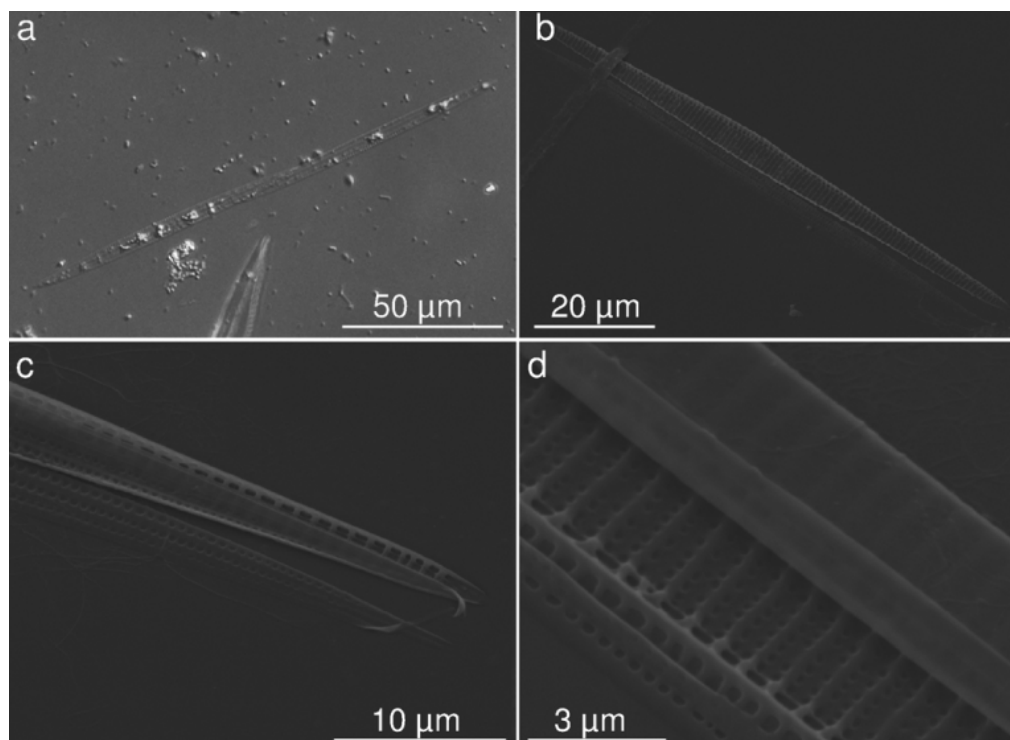
4.9.3 *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS*

U Jadranu se obično pojavljuje u zimskim mjesecima od prosinca do veljače, kada je pronađena u uzorcima iz Limskog kanala (Slika 4.30.) i sjevernog Jadrana (Slika 4.31.). Obično se pojavljuje zajedno s vrstom *P. fraudulenta*. Valve su linearnog do lanceolantnog oblika. Dužina stanica se kretala od 88 do 105 μm , a širina valve od 3,9 do 5,8 μm (Slika 4.30. a-c). Njene kolonije su linearanog oblika s preklapanjem od 21-30 % između stanica (Slika 4.30.). Broj strija bio je od 8 do 15 u 10 μm , a broj fibula od 10 do 17 u 10 μm . Strije su perforirane s po dva reda pora (2-4 u 1 μm). Nedostaje središnja pora.

Usporedba morfoloških karakteristika vrste *P. pungens* iz literature s onim iz Limskog kanala za vrijeme cvjetanja 2008. i sjevernog Jadrana 2009. data je u Tablici 4.9. Posebno su istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime minimalan broj strija bio je 8 u 10 μm .



Slika 4.30. *Pseudo-nitzschia pungens*. a) mikrografija kolonije na svjetlosnom, i b-c) elektronskom mikroskopu (TEM). b) Vrh valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama, c) sredina stanice. Preuzeto iz Ljubešić i sur. (2011).



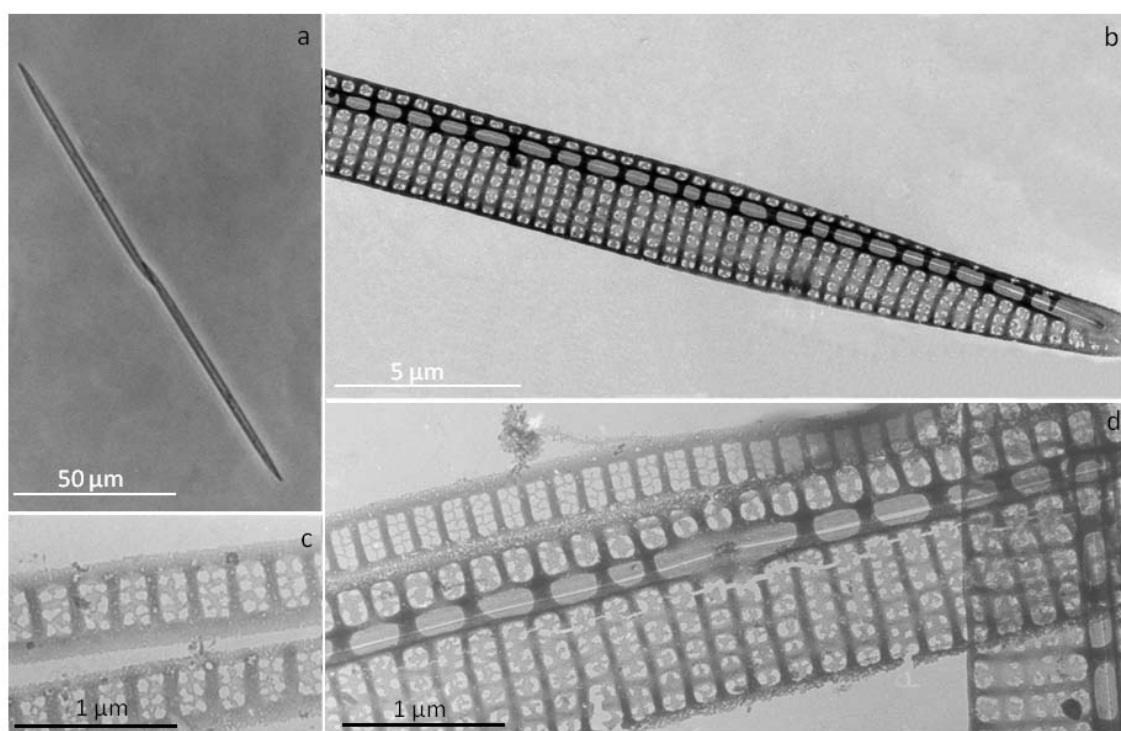
Slika 4.31. *Pseudo-nitzschia pungens*. Mikrografija kolonije a) na svjetlosnom i b-d) elektronskom mikroskopu (SEM). b) cijela valva c) vrh valve i s vidljivom rafom i cingularnim pojasom, d) središnji dio valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama.

Tablica 4.9. Morfološka mjerenja vrste *P. pungens* objavljena u literaturi i onih iz sjevernog Jadrana. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

Dužina/ µm		Širina/ µm		Fibule/ 10 µm		Strije/ 10 µm		Pore/ 1 µm		R./ p.	literatura
Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
mjerenja iz literature											
74	142	3	4,5	9	15	9	15	3	4	1-2	Hasle i sur., 1996
87	174	4,6	5	9	15	9	17	3	4	2	Rivera, 1985
79	117	2,9	4,6	-	-	10	14	-	-		Fryxell i sur., 1990
90	130	2,6	4,5	10	15	10	15	3	4	2	Hallegraeff, 1994
89	152	3,1	5,0	10	14	10	14	-	-	2	Lee, 1994
74	142	2,9	4,5	9	15	9	15	3	4	2	Hasle i sur., 1996
94	109	3,0	4,0	10	11	10	12	-	-	2	Hernández-Becerrill, 1998
75	106	1,5	3,8	-	-	-	-	-	-		Rhodes, 1998
86	145	2,8	4,5	12	18	10	18	3	4	2	Ferrario i sur., 1999
100	155	1,8	4,0	10	20	10	14	2	4		Skov i sur., 1999
72	135	2,4	4,5	9	13	9	13	2	4	2(3)	Stonik i sur., 2001
86	145	2,8	4,5	12	18	12	18	3	4	2	Ferrario i sur., 2002
61	156	2,2	5,4	10	16	10	16	2	4		Cusack i sur., 2004
92	156	3,5	4,2	10	11	10	11	1	3	2	Kaczmarska i sur., 2005
82	139	2,8	4,5	10	15	10	15	3	4		Srednja vrijednost
mjerenja iz sjevernog Jadrana											
88	105	3,9	5,7	10	17	8	15	2	4	2	Ljubešić i sur., 2011.
94	97	4,3	5,8	13	15	10	15	2	4	2	CIM 3.1
91	101	4,1	5,7	11	16	9	15	2	4	2	Srednja vrijednost

4.9.4 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

Vrsta *P. mannii* pojavila se s cvjetanjem grupe *P. pseudodelicatissima sensu latu* u kolovozu u Lirskom kanalu. Najviše dostignute abundancije bile su do 10^5 stanica L^{-1} . Vrsta *P. mannii* pojavila se zajedno s *P. calliantha* i *P. pseudodelicatissima*. *P. mannii* i *P. calliantha* dominirale su cvjetanjem, dok je *P. pseudodelicatissima* bila vrlo rijetka. Detaljnim pregledom i mjerenjem očišćenih frustula na elektronskom mikroskopu po prvi put u Jadranskom moru utvrđena je vrsta *P. mannii*, što se potvrdilo i molekularnim metodama na izoliranim kulturama.



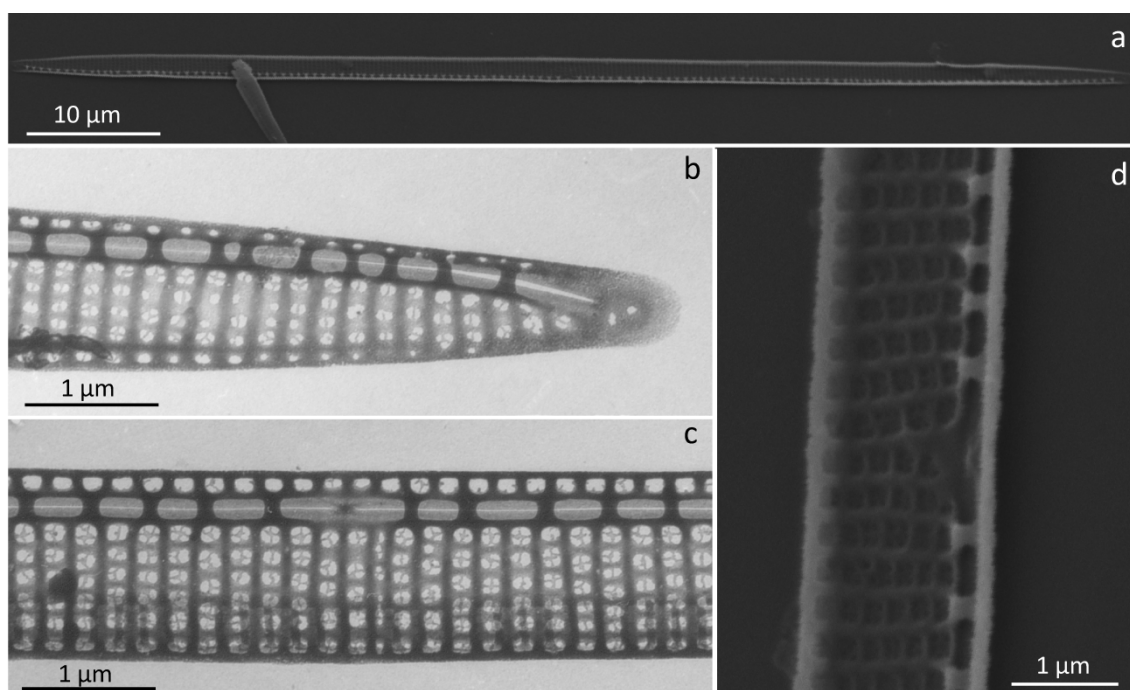
Slika 4.32. *Pseudo-nitzschia mannii*, u pleuralnom položaju mikrografija stepenaste kolonije na svjetlosnom mikroskopu (a) i elektronskom mikroskopu (b-d; TEM). Vrh valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama (b). Drugi i treći cingularni/bočni pojas (c). Sredina valve sa središnjom porom i strukturom aureola (d). Preuzeto iz Ljubešić i sur. (2011).

Stanice vrste *P. mannii* linearnog su oblika i tvore stepenaste kolonije s kratkim preklapanjem između stanica 10-14 % (Slika 4.32. a). Dužina stanica bila je od 77 do 98 μm , a širina valve od 1,3 do 1,7 μm (Slika 4.32. a-c). U svim stanicama je bila prisutna i velika središnja pora. Broj strija bio je od 34 do 41 u 10 μm , a broj fibula od 19 do 24 u 10 μm . Strije su perforirane jednim redom velikih četvrtasto/okruglih pora gustoće 4-6 u 1 μm . Pore su podijeljene u dva do četiri sektora s radijalnom simetrijom (Slika 4.32. d).

Prvi cingularni pojas ukrašen je dvostrukim (engl. *Biseriate*) strijama jednostavnih pora (Slika 4.32. d). Strije su visoke 0,2 μm ili četiri reda pora. Drugi i treći cingularni pojas su slabije silificirani i imaju sličan obrazac dvostrukih strija i visinu od tri reda jednostavnih pora (Slika 4.32. c).

4.9.5 *PSEUDO-NITZSCHIA PSEUDODELICATISSIMA*

Vrsta *P. pseudodelicatissima* pojavila se u cvjetanju grupe *P. pseudodelicatissima sensu lato* u kolovozu u Limskom kanalu. Najviše dostignute abundancije bile su do 10^5 stanica L^{-1} . *P. mannii* i *P. calliantha* dominirale su cvjetanjem, dok je *P. pseudodelicatissima* bila vrlo rijetka, a određena je još u cvjetanju u kolovozu u sjevernom Jadranu.



Slika 4.33. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* a i d) mikrografija kolonije na pretražnom (SEM) i b-c) transmisijском elektrоnskom mikroskopu (TEM). a) valva stanice u cijeloj svojoj dužini, b) vrh valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama, c) sredina stanice sa središnjom porom, d) sredina stanice, struktura pora i središnja pora na SEM-u. Preuzeto iz Ljubešić i sur. (2011).

Stanice vrste *P. pseudodelicatissima* bile su linearnog oblika i prisutne su u kolonijama (Slika 4.33. a). Dužina stanica bila je od 56,8 do 81,0 μm , a širina valve od 1,15 do 1,71 μm (Slika 4.33. a-c). U svim stanicama bila je prisutna i velika središnja pora. Broj

strija bio je od 23 do 40 u 10 μm , a broj fibula od 18 do 24 u 10 μm . Strije su perforirane jednim redom velikih okruglo/četvrtastih pora s tri do pet pora na 1 μm . Pore su podijeljene u dva do četiri sektora (Slika 4.33. d).

Usporedba morfoloških karakteristika iz literature s detaljnim morfološkim mjerenjima za vrstu *P. pseudodelicatissima* iz sjevernog Jadrana nađenim za vrijeme cvjetanja 2008. data je u Tablici 4.10. Posebno su istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime minimalni broj strija bio je 23 u 10 μm , a pora tri u 1 μm .

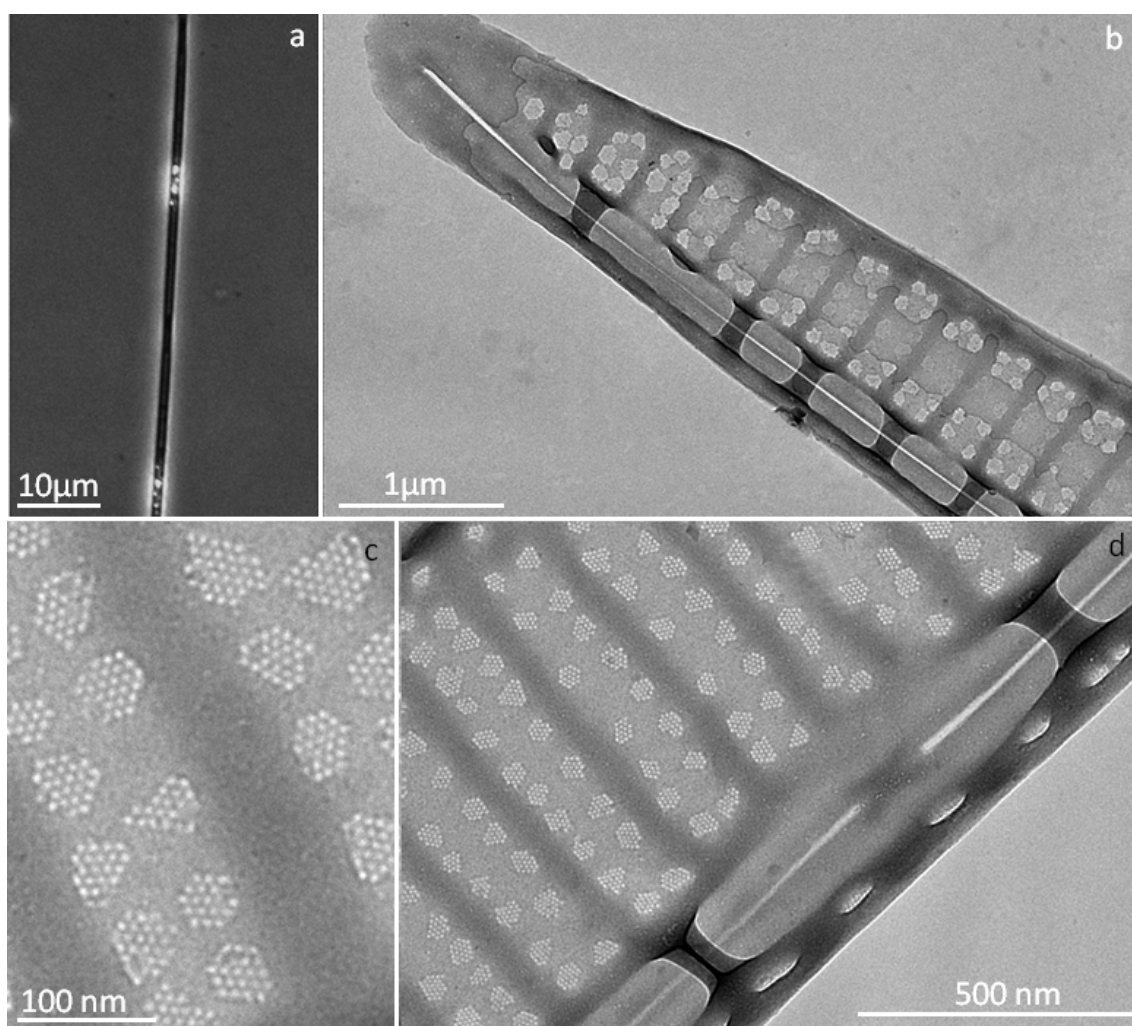
Tablica 4.10. Morfološka mjerenja vrste *P. pseudodelicatissima* objavljena u literaturi i onih kultura iz sjevernog Jadrana. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

Dužina/ μm		Širina/ μm		Fibule/ 10 μm		Strije/ 10 μm		Pore/ 1 μm		R./ p.	literatura
Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
mjerenja iz literature											
70	87	1,1	1,4	20	25	36	42	5	5	1	Lundholm i sur., 2003
70	80	1,2	1,6	20	23	36	42	5	6	1	Lundholm i sur., 2003
54	56	1,2	1,4	23	25	39	40	5	6	1	Lundholm i sur., 2003
56	78	0,9	1,3	21	25	40	43	5	6	1	Lundholm i sur., 2003
48	140	1,2	2,5	17	26	28	44	4	6	1	Ferrario i sur., 2002
54	80	1,2	2,1	20	27	38	43	5	6	1	Kaczmarska i sur., 2005
-	-	1,5	1,9	10	29	34	45	4	7	1	Amato i sur., 2007
mjerenja iz sjevernog Jadrana											
77	98	1,15	1,7	18	24	23	40	3	5	1	Ljubešić i sur., 2011.
61	88	1,2	1,7	18	26	34	42	4,5	5,8	1	Srednja vrijednost

Kratice: R/p: broj redova pora unutar strija

4.9.6 *PSEUDO-NITZSCHIA DELLICATISSIMA*

Vrsta *P. delicatissima* pojavila se tijekom cvjetanja grupe *P. pseudodelicatissima sensu latu* koje je trajalo od travnja do srpnja 2009. na postaji RV001. Iako abundancija nije bila visoka ($8,8 \times 10^3$ stanica L^{-1}) izolirane su kulture za dva različita genotipa ove vrste. Isti genotipovi ponovno su izolirani u prosincu 2011. na postajama RV001 i SJ101. Stanice vrste *P. delicatissima* linearnog su oblika i prisutne su u kolonijama (Slika 4.34. a). Dužina stanica bila je od 55,7 do 110,1 μm , a širina valve od 0,8 do 1,73 μm (Slika 4.34. a-c).



Slika 4.34. *Pseudo-nitzschia delicatissima* a) mikrografija kolonije na svjetlosnom i b-d) transmisijском електронском микроскопу (TEM). a) kolonija stanica, b) vrh valve s vidljivom rafom, fibulama i strijama, c) struktura pora, d) sredina stanice i središnja pora na TEM-u.

U svim stanicama je bila prisutna i velika središnja pora širine 5-6 strija. Broj strija bio je od 40 do 48 u 10 μm , a broj fibula od 20 do 40 u 10 μm . Strije su perforirane s dva reda pora, ili jednim redom pora vrlo sporadično u blizini središnje pore (Slika 4.34. d). Pore imaju karakterističan oblik (od trokutastog do šesterokutnog) obično nalazimo od 7-13 pora u 1 μm , a velum je perforiran sitnim rupicama (Slika 4.34. d).

Usporedba morfoloških karakteristika *P. delicatissima* iz sjevernog Jadrana uspoređena s literaturnim mjerenjima prikazana je u Tablici 4.11.

Tablica 4.11. Morfološka mjerenja vrste *P. delicatissima* objavljena u literaturi i onih kultura iz sjevernog Jadrana 2009. i 2011. godine. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

Dužina/ μm		Širina/ μm		Fibule/ 10 μm		Strije/ 10 μm		Pore/ 1 μm		R./ p.	literatura
Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
mjerenja iz literature											
40	76	2,0	2,0	36	40	36	40	10	12	2	Hasle&Fryxell, 1995
34	88	1,7	3,9	27	39	37	39	-	-	2	Rivera, 1985
40	76	1,0	2,0	20	23	36	40	-	-	2	Hasle&Fryxell, 1995
42	66	1,0	1,5	20	23	40	40	10	12	2	Hasle i sur., 1996
27	77	1,2	2,2	19	22	33	38	-	-	-	Villac, 1996 (okoliš)
45	-	-	1,8	19	19	32	32	10	10	2	Villac, 1996 (kulture)
37	77	0,9	1,8	20	26	37	43	8	12		Skov i sur., 1999
24	64	1,2	2,4	20	26	39	44	9	13		Cusack i sur., 2004
27	88	1,0	2,2	20	23	36	40	10	12		Ferrario i sur., 2004
-	-	2,0	2,0	22	22	33	35	8	11	2	Orsini i sur., 2004
-	-	1,8	2,0	22	22	33	35	9	9		Orsini i sur., 2004
-	-	2,0	2,0	24	24	36	36	9	9		Orsini i sur., 2004
-	-	1,8	2,0	23	23	35	40	9	10		Orsini i sur., 2004
-	-	2,0	2,0	24	28	36	41	10	11		Orsini i sur., 2004
-	-	2,4	2,6	20	23	36	28	5	9		Orsini i sur., 2004
-	-	-	-	22	29	33	43	8	11		Amato i sur., 2005
50	70	0,6	1,8	18	26	-	-	8	9	2	Caroppo i sur., 2005
39	71	1,3	1,7	20	30	37	42	9	12,5	2	Kaczmarska i sur., 2005
19	76	1,5	1,8	19	26	37	42	8	12	2	Lundholm i sur., 2006
		1,8	2,3	21	26	38	41	6	10		Amato i sur., 2007
		1,5	1,8	23	28	42	44	7	10		Amato i sur., 2007
35	75	1,5	2,1	20	25	36	40	9	11		Srednja vrijednost
mjerenja iz sjevernog Jadrana											
		0,96	1,54	25	30	40	45	7	10	1-2	CIM 32.1.1
55	110	-	1,2	20	35	38	45	8	9	2	CIM 33.1.1.1
		1,1	1,6	20	30	39	44	8	9	2	CIM 38.1.1
		0,8	1,0	24	40	38	43	10	13	2	CIM 40.1.1.1.1
		1,0	1,7	20	28	40	48	7	9	2	CIM 7.2.2.1.1.1
		0,9	1,48	22	32	39	45				Srednja vrijednost

Kratice: R/p: broj redova pora između unutar strija; CIM interna numeracija kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana

U Tablici 4.11. se nalaze detaljna morfološka mjerenja za vrstu *P. delicatissima* s mjerenjima iz kultura izoliranim u sjevernom Jadranu. U tablici su posebno istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime najviši broj strija u 10 μm bio je 48, a pora 13 u 1 μm .

Gotovo sve kulture vrste *P. delicatissima* (CIM 32.11, CIM 33.1.1.1., CIM 38.1.1 CIM 40.1, CIM 7.2.2.1.1 i to u brojnim replikatima i u različitim fazama rasta) podvrgnute su mjerenjima domoične kiseline. Unatoč tome DK nije izmjerena i nije dokazana toksičnost vrste *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu.

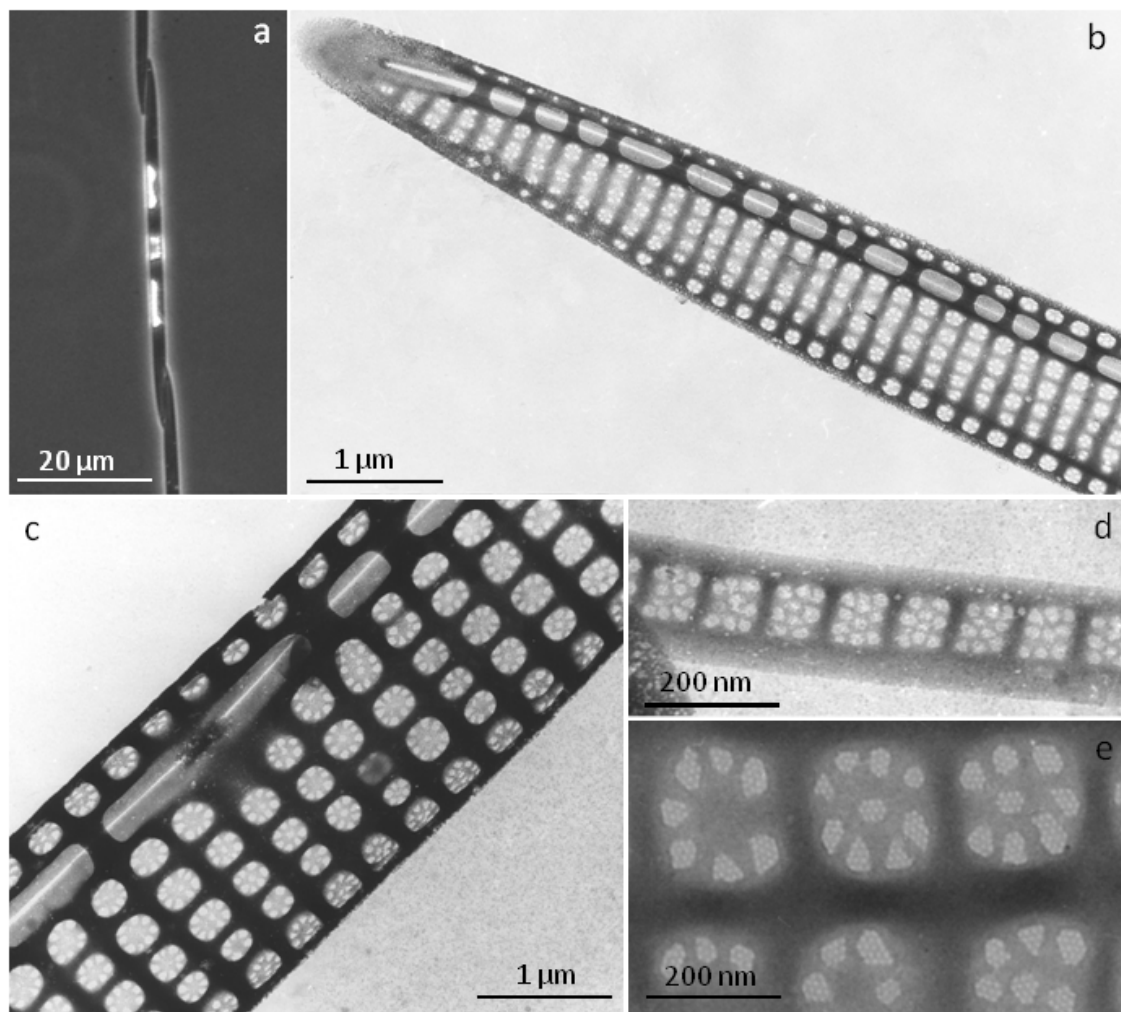
4.9.7 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Vrsta *P. calliantha* dominirala je cvjetanjem koje je trajalo od kolovoza do listopada duž istočne obale sjevernog Jadrana 2007. godine i cvjetanjem u kolovozu 2008. u Lirskom zaljevu. Kultura vrste *P. calliantha* izolirana je s postaje RV001 u srpnju 2011. Ovo znači da ovu vrstu redovito susrećemo u sjevernom Jadranu od srpnja do listopada. Najviše zabilježene abundancije bile su do 10^6 stanica L^{-1} . Vrsta je potvrđena detaljnim pregledom i mjerenjem očišćenih frustula na elektronskom mikroskopu.

Kolonije su bile linearanog oblika s kratkim preklapanjem (11,7-13,5 μm) između stanica (Slika 4.35.). Dužina stanica kretala se od 59 do 112 μm , a širina valve od 0,7 do 1,7 μm (Slika 4.35.).

Za vrijeme cvjetanja nisu zabilježene razlike u morfologiji frustule *P. calliantha* među postajama u sjevernom Jadranu iako su mjerenja pomaknula morfološki raspon do sada objavljen u literaturi (Tablica 4.12.). Broj fibula kretao se od 17-27 u 10 μm (Slika 4.35.).

U svim stanicama bila je prisutna i središnja pora (Slika 4.35.c). Broj strija bio je od 32-45 u 10 μm i imale su jedan red velikih pora su obliku cvijeta s četiri do 10 aureola (Slika 4.35.). Cingularni pojas perforiran je strijama, širokim dvije tri pore s različitim brojem pora, čiji se broj smanjuje sa širinom valve (Slika 4.35.d).



Slika 4.35. *Pseudo-nitzschia calliantha* a) mikrografija kolonije na svjetlosnom i b-e) elektronskom mikroskopu (TEM). b) vrh valve i s vidljivom rafom, fibulama i strijama, c) središnja pora, fibule d) pojas, e) struktura aureola. Preuzeto iz Ljubešić i sur. (2011).

Usporedbu morfoloških karakteristika iz literature s detaljnim morfološkim mjerenjima vrste *P. calliantha* iz sjevernog Jadrana nađene tijekom cvjetanja 2007., 2008. i u kulturama izoliranim iz sjevernog Jadrana donosi Tablica 4.12. Posebno su istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime najmanja širina stanice u sjevernom Jadranu bila je 0,7 µm, najveći broj fibula bio je 27 u 10 µm, a strija 45 u 10 µm.

Domoična kiselinu mjerena je u kulturama vrste *P. calliantha* (CIM 469, CIM 546) sakupljenih s različitih postaja u različito doba godine u sjevernom Jadranu. Unatoč tome DK nije izmjerena i nije potvrđena toksičnost kultura vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu.

Tablica 4.12. Morfološka mjerenja vrste *P. calliantha* objavljena u literaturi i onih iz sjevernog Jadrana 2007., 2008. i 2011. godine. Vrijednosti mjerenja koja se razlikuju od literature su podebljana.

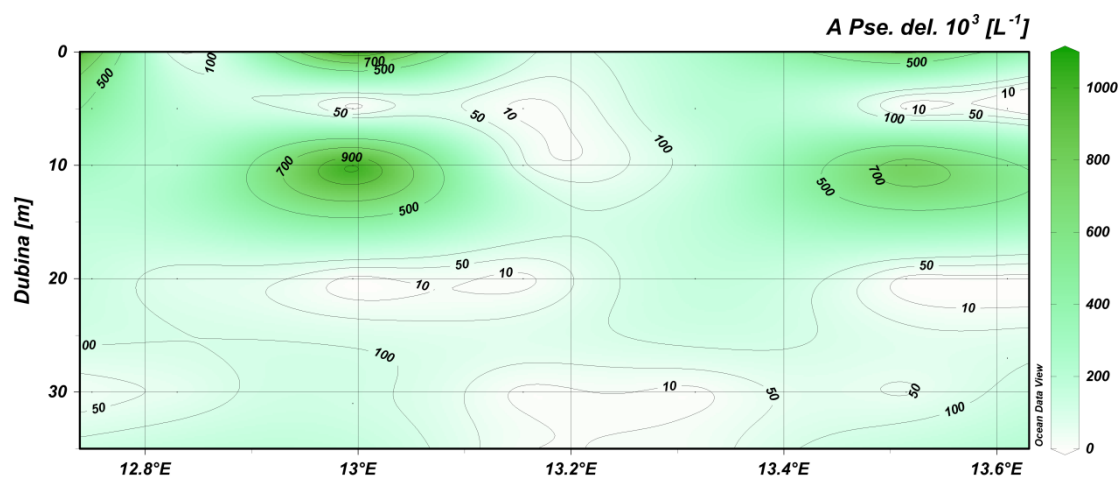
Dužina/ μm		Širina/ μm		Fibule/ 10 μm		Strije/ 10 μm		Pore/ 1 μm		R./ p.	literatura
Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
Mjerenja iz literature											
60	63	1,3	1,4	19	20	39	40	6	6	n.r.	Bargu i Lundholm, 2002
44	66	1,7	1,7	18	19	37	39	5	5	1	Lundholm i sur., 2003
41	68	1,7	1,7	17	20	36	39	5	5	1	Lundholm i sur., 2003
41	63	1,5	1,7	20	21	36	38	4	6	n.r.	Lundholm i sur., 2003
47	72	1,5	1,8	19	21	36	38	5	5	n.r.	Lundholm i sur., 2003
62	98	1,5	1,8	5	19	34	38	5	5	n.r.	Lundholm i sur., 2003
69	69	1,4	1,6	18	22	36	38	4	5	n.r.	Lundholm i sur., 2003
90	90	1,5	1,7	18	22	34	38	5	5	n.r.	Lundholm i sur., 2003
67	77	1,5	1,8	20	22	38	39	5	6	n.r.	Lundholm i sur., 2003
n.r.	n.r.	1,4	1,4	16	20	36	36	4	5	1	Lundholm i sur., 2003
66	77	1,4	1,8	16	18	34	34	5	5	1	Lundholm i sur., 2003
83	87	1,4	1,8	16	21	34	36	5	5	1	Lundholm i sur., 2003
n.r.	n.r.	1,5	1,7	15	19	34	39	4	5	1	Lundholm i sur., 2003
n.r.	n.r.	1,4	1,4	17	20	34	36	5	6	1	Lundholm i sur., 2003
80	110	1,5	2,2	18	20	n.r.	36	n.r.	n.r.	1	Caroppo i sur., 2005
n.r.	n.r.	1,7	2,4	18	24	32	39	4	6	n.r.	Amato i sur., 2007
n.r.	n.r.	1,7	2,6	17	25	30	40	4	6	n.r.	Amato i sur., 2007
62	100	1,5	2	16	20	37	39	6	10	1	Spatharis i sur., 2007
41	123	1,1	2,4	15	26	30	40	4	5	1	Quijano i sur., 2008
40	87	1,5	1,8	15	20	32	38	5	6	1	Orlova i sur., 2008
63	94	1,5	1,8	14	18	35	39	4	6	n.r.	Orlova i sur., 2008
64	98	1,5	2,1	17	19	39	39	4	5	n.r.	Burić i sur., 2008
60	85	1,48	1,85	16,5	20,7	34,9	38	4,6	5,6		Srednja vrijednost
Mjerenja iz sjevernog Jadrana											
59	112	0,7	1,7	17	27	33	45	4	10	n.r.	Marić i sur., 2011
74	93	0,7	2	17	27	32	45	4,1	8,7		Ljubešić i sur., 2011
50	92	0,8	2,9	17	25	30	40	4	10		CIM 469
56	127	1,9	2,6	18	20	34	40	4	10		CIM 546
59,7	106	1	2,3	17,3	24,7	32,2	42,5	4	9		Srednja vrijednost

Kratice: R/p: broj redova pora između unutar strija; CIM interna numeracija kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana

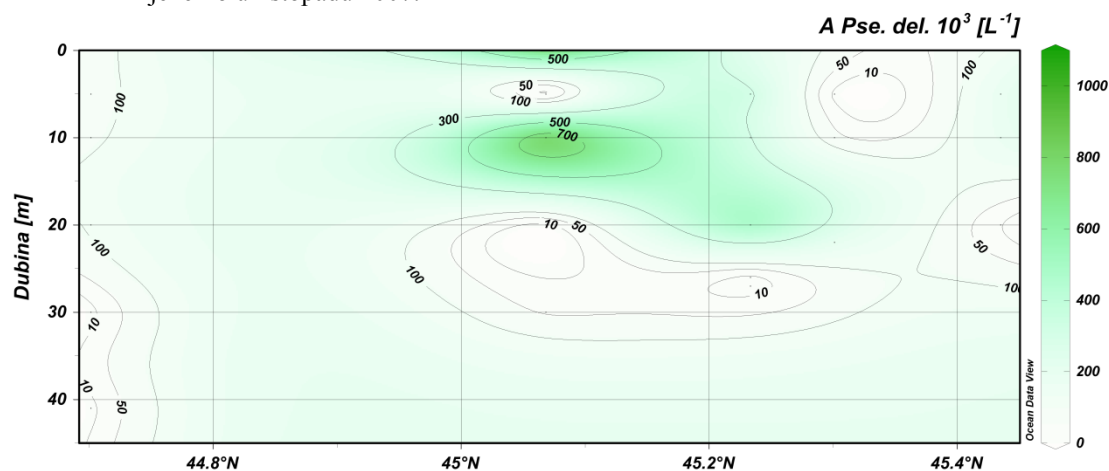
4.10 CVJETANJE VRSTE *P. CALLIANTHA* U SJEVERNOM JADRANU

4.10.1 PROSTORNA RASPODJELA

Prostorna raspodjela grupe *Pseudo-nitzschia delicatissima* prikazana je na Slikama 4.36. i 4.37. za listopad 2007. Najviša abundancija ($>500 \times 10^3$ stanica L^{-1}) zabilježena je na profilu Rovinj - ušće rijeke Po na površini i u sloju do 10 metara dubine (Slika 4.36.). Na transektu uzduž istarske obale (Slika 4.37.) najviše abundancije također su zabilježene u podpovršinskom sloju do dubine od 10 m (600×10^3 stanica L^{-1} na postaji ZI032). Cvjetanje grupe *P. delicatissima* započelo je u kolovozu i trajalo je do studenog. Cvjetanjem je dominirala vrsta *P. calliantha* što je potvrđeno elektronskim mikroskopom.



Slika 4.36. Prostorna raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na profilu Rovinj - ušće rijeke Po u listopadu 2007.



Slika 4.37. Prostorna raspodjela abundancije grupe *P. delicatissima* (stanica L^{-1}) na postajama uz istarsku obalu u listopadu 2007.

4.10.2 EKOLOŠKI ČIMBENICI

Tijekom cvjetanja vrste *P. calliantha* vrijednosti temperature mora kretale su se od 16,97 do 22,12 °C (Tablica 4.13.), a saliniteta od 37,13 (na postaji SJ107) do 37,82 (na postaji ZI042). Vrijednosti koncentracije ortofosfata bile su niske od ispod limita detekcije (<0,02) do 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Koncentracija ortosilikata kretala se u rasponu od 0,11-2,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Raspon koncentracije klorofila *a* bio je 0,26-1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ u skladu s brojem stanica. Dodatni podatci o koncentraciji hranjivih soli i klorofila *a* s odgovarajućim morfološkim mjerenjima i abundancijom vrste *P. calliantha* date su u Tablici 4.13. Otopljeni anorganski dušik (DIN) kretao se od 1,25-3,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Koncentracija amonija bila je niska u rasponu od limita detekcije 0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do 0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tablica 4.13. Minimalna (min), maksimalna (max), srednja vrijednost (avg) i standardna devijacija (s.d.) abundancije vrste *P. calliantha*, morfološka mjerenja frustula i vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara i klorofila *a* za vrijeme cvjetanja *P. calliantha*.

Postaja	ZI012	SJ107	SJ209	ZI042	ZI022	SJ107	JPG38
Vrijeme uzorkovanja	21.9.07.	24.9.07.	2.10.07.	21.10.07.	15.10.07.	17.10.07.	29.10.07.
Dinamika							
min (stanica 10^3 L^{-1})	227	165	100	75	230	395	165
max (stanica 10^3 L^{-1})	304	285	241	106	606	1207	201
avg (stanica 10^3 L^{-1})	276	232	176	888	378	842	74
s.d.	42,72	62,54	62,08	14,43	40,48	427	116
Morfolologija							
Širina / μm	0,9	1,37	1,3	1,04	1,43	1,63	1,4
fibule /10 μm	21,77	22,12	20,69	22,14	19,66	20,66	21,5
strije /10 μm	37,55	37,87	38,46	39,85	37,33	35	40
aureole /10 μm	43	51,87	53,69	57,14	72,66	51,83	58,5
Ekologija							
<i>t</i> /°C	21,27	22,12	21,03	20,31	19,56	19,73	16,97
<i>S</i>	37,52	37,41	37,79	37,82	37,70	37,13	37,57
<i>c</i> (PO ₄)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,03
<i>c</i> (NO ₂)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,27	1,21	1,86	2,11	2,13	2,06	2,83
<i>c</i> (NO ₃)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,20	0,04	0,03	0,12	0,14	0,09	0,52
<i>c</i> (NH ₄)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,06	<0,05	0,06	0,15	0,12	0,12	0,19
<i>c</i> (DIN)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,30	1,25	1,95	2,38	2,38	2,27	3,54
<i>c</i> (SiO ₄)/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,17	0,11	0,48	1,99	1,83	0,32	2,94
<i>c</i> (Chl <i>a</i>)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	0,33	0,35	0,26	0,43	0,60	1,08	1,10

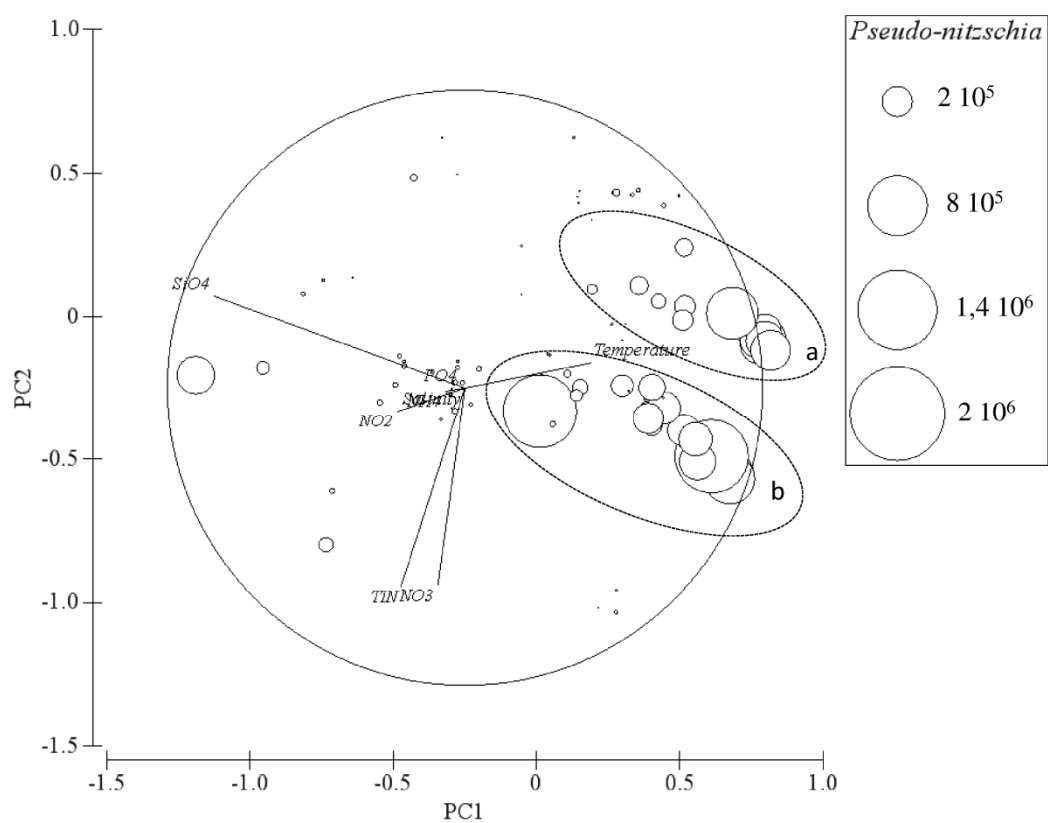
4.10.3 KORELACIJE EKOLOŠKIH ČIMBENIKA I ABUNDANCIJE

Abundancija grupe *Pseudo-nitzschia delicatissima* značajno se korelira s koncentracijom otopljenog anorganskog dušika i ortosilikata, kao i s temperaturom i salinitetom ($p < 0,05$). Detaljne korelacije donosi Tablica 4.14. (značajne korelacije su podebljane).

PCA analiza generirala je 5 glavnih komponenti, prve tri komponente opisivale su 96,3 % varijance izvornog skupa podataka. Prva glavna komponenta (PC1) objasnila je 54,4 % od ukupne varijance, a pretežno se odnosila na ortosilikat i temperaturu. Druga glavna komponenta (PC2) objasnila je 33,1 % varijance i odnosila se na nitrata, dok je treća (PC3) bila značajno korelirana s temperaturom i nitratima, te objasnila 8,8 % varijance. Na Slici 4.38. mogu se razlikovati dvije grupe: ljetno-jesenska koje su vezane s višim temperaturama i većom abundancijom grupe *P. delicatissima* i zimsko-proljetna grupa, kojoj više odgovaraju niže temperature i više koncentracije ortosilikata (Slika 4.38.).

Tablica 4.14. Spearman korelacije ekoloških čimbenika s abundancijom grupe *P. delicatissima*. Podebljane su značajne korelacije.

Parametar	Koeficijent korelacije
Temperatura	0,2
Salinitet	-0,292
NO ₂	0,035
NO ₃	-0,051
NH ₄	-0,078
DIN	-0,07
SiO ₄	-0,031
PO ₄	0,117
pH	0,175



Slika 4.38. Prikaz prve dvije glavne komponente PCA analize ekoloških čimbenika i abundancije grupe *P. delicatissima*, zimsko/proljetna grupa (a) i ljetno-jesenska grupa (b) tijekom cvjetanja 2007. u sjevernom Jadranu.

4.11 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE 18S

Hipervarijabilno područje regije 18S rDNA omogućuje odvajanje svih do sada poznatih vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia*. Problem postoji jedino za vrste: *P. multiseriata*, *P. australis* i *P. turgidula*, budući se za različite sojeve ovih vrsta u NCBI-u katkada pojavljuju jednake sekvence. Za neke vrste u NCBI-u postoji nekoliko tipova sekvenci za regiju 18S, npr. *P. delicatissima*, *P. seriata*, *P. fraudulenta* i *P. calliantha*.

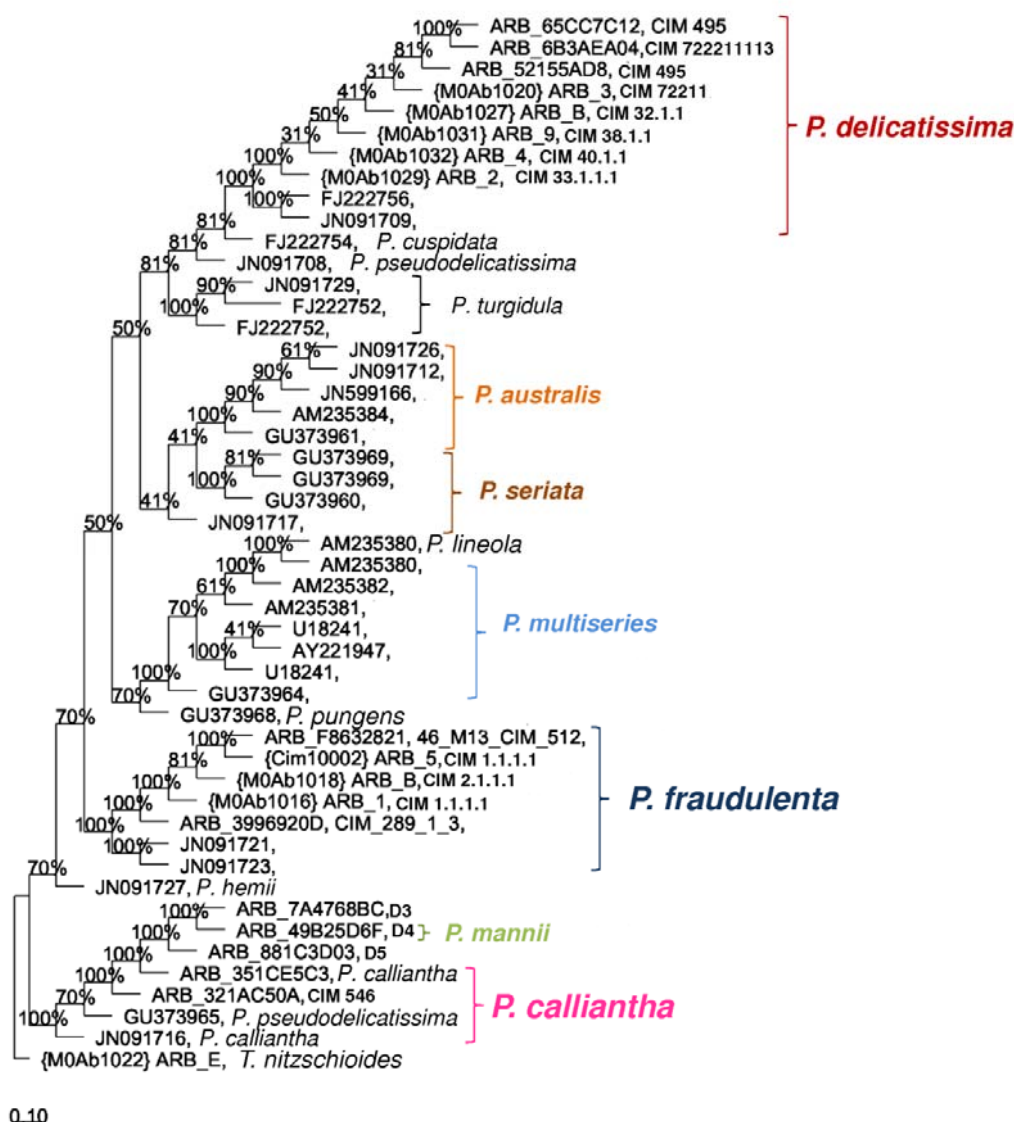
Osim za vrstu *P. calliantha* (za koju su vjerojatno u NCBI unesene pogrešne sekvence) za ostale vrste različiti tipovi sekvenci 18S grupiraju se većinom zajedno (što se vidi na oba stabla, Slike 4.39. i 4.40.).

Analizom ove regije na izoliranim kulturama različitih vrsta *Pseudo-nitzschia* iz sjevernog Jadrana potvrđeno je postojanje vrsta *P. fraudulenta*, *P. delicatissima*, *P. calliantha* i *P. mannii*, čije su sekvence uspoređene s postojećim sekvencama u NCBI i provedena je filogenetska analiza.

U sjevernom Jadranu za vrstu *P. delicatissima* pronađena su četiri različita tipa regije 18S rDNA (predstavljaju vjerojatno četiri različite populacije). Prvi tip pronađen je na postaji SJ101 u prosincu 2011., te u travnju, lipnju i srpnju 2009. godine na postaji RV001. Isti tip regije 18S rDNA pronađen je u Atlantskom oceanu u blizini države Maine (SAD). Drugi tip izoliran je na postaji RV001 u srpnju 2009. Treći tip izoliran je na postaji SJ101 u prosincu 2011, a četvrti na postaji RV001 u travnju 2009. Sva četiri tipa mogu se pronaći na području sjevernog Jadrana. Prvi i treći pronađeni su u isto vrijeme na postaji SJ101 u prosincu 2011. godine.

Tablica 4.15. Postaje i vrijeme uzorkovanja različitih tipova sekvenci za 18S za vrste *P. delicatissima* i *P. fraudulenta*.

<i>P. delicatissima</i>	18S rDNA	postaja	datum
	Tip 1.	SJ101	prosinac 2011.
		RV001	trav., lip., srp. 2009.
	Tip 2.	RV001	srpanj 2009.
	Tip 3.	SJ101	prosinac 2011.
	Tip 4.	RV001	travanj 2009.
	Tip 1.	RV001	svibanj 2009.
		SJ108	travanj 2009.
		LIM3	prosinac 2011.
		SJ101	prosinac 2011.

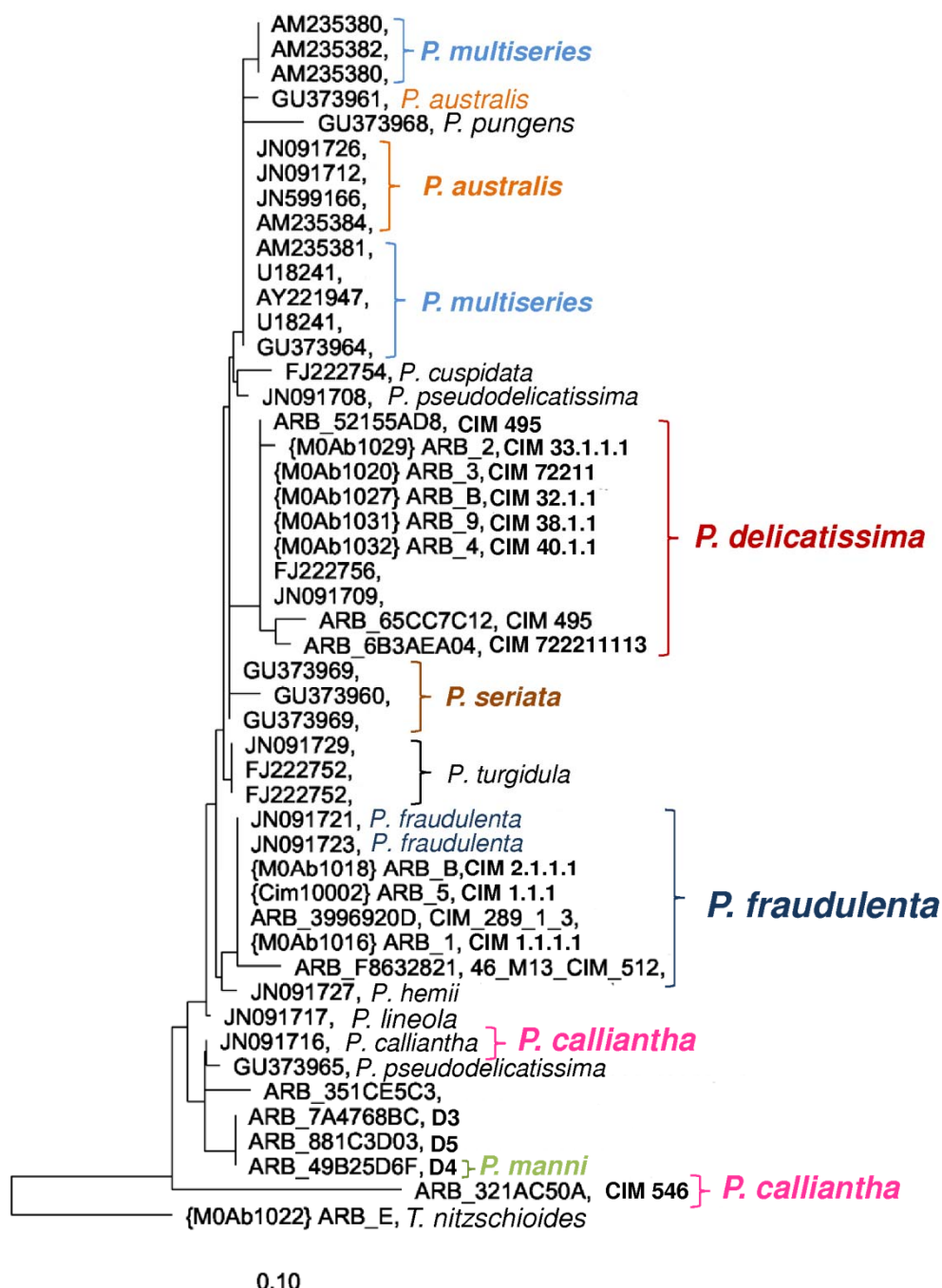


Slika 4.39. Najizglednija filogenetska rekonstrukcija (engl. *Maximum likelyhood analysis*, ML) za hipervarijabilnu regiju 18S rDNA. Prikazane su bootstrap vrijednosti nakon 1000 iteracija. Stablo je strogi konsenzus 100 najboljih stabala. Stablo u potpunosti riješeno nema višestrukog grananja. Brojevi na granama ukazuju na vjerojatnost (u %) kojom se podupire položaj svake grane.

Prvi je tip bio prisutan na postaji RV101 od travnja do srpnja 2009., te ponovno u prosincu 2011. na postaji SJ101. Prvi i četvrti bili su prisutni u isto vrijeme na postaji RV001 u travnju 2009. godine.

U sjevernom Jadranu otkrivena su i dva različita tipa sekvenci za regiju 18S rDNA za vrstu *P. fraudulenta*. Prvi tip je izoliran iz Atlantskog oceana u blizini države Maine (SAD), te na postaji RV001 u svibnju 2009., kao i na postaji SJ108 u travnju 2009., a

isti tip 18S ponovno je pronađen u Limskom kanalu (LIM 3) u prosincu 2011. godine. Drugi je izoliran na postaji SJ101 u prosincu 2011.



Slika 4.40. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) za hipervarijabilnu regiju 18S rDNA. Višestruko grananje prikazuje identične sekvence. Mjerka označava 10 % razliku u stablu. Vrsta *T. nitzschoides* korištena je za «zakorjenjivanje» kladograma.

4.12 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE ITS1-5,8S-ITS2

4.12.1 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

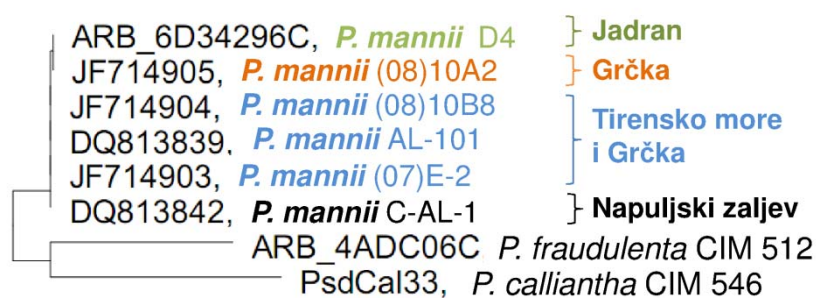
Za molekularno određivanje vrste *P. manni* korištene regije kodirajuće DNA za ribosomsku RNA su unutarnje transkribirajuće razmaknice regija ITS1 i ITS2 uključujući 5,8S rRNA.

Sekvence regije ITS1-5,8S-ITS2 omogućuju nedvosmisleno određivanje vrste *P. mannii*. Matrica različitosti pokazuje intraspecifičnu različitost manju od 0,6 %, a u isto vrijeme različitost od blisko povezanih vrsta *P. calliantha* i *P. fraudulenta* veća je od 26 % (Tablica 4.16. i Slika 4.41.).

Tablica 4.16. Matrica različitosti za vrstu *P. mannii* prema sekvencama regije ITS1-5,8S-ITS2 na izolatima iz Sredozemnog, Egejskog i Jadranskog mora. Kratice sekvenci i njihovo geografsko porijeklo nalaze se u kladogramu na slici 4.41.

	ARB_6D34296C, D4	JF714905, (08)10A2	JF714904, (08)10B8	DQ813839, AL-101	JF714903, (07)E-2	DQ813842, C-AL-1	CIM 512, <i>P. fraudulenta</i>	CIM 546, <i>P. calliantha</i>
ARB_6D34296C, D4	0							
JF714905, (08)10A2	0,3	0						
JF714904, (08)10B8	0,3	0,3	0					
DQ813839, AL-101	0,3	0,3	0	0				
JF714903, (07)E-2	0,3	0,3	0	0	0			
DQ813842, C-AL-1	0,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0		
CIM 512, <i>P. fraudulenta</i>	26,8	26,8	26,5	26,5	26,5	26,5	0	
CIM 546, <i>P. calliantha</i>	31,7	31,7	31,4	31,4	31,4	31,4	42,1	0

Kratice: D4 kultura izolirane iz srednjeg Jadrana

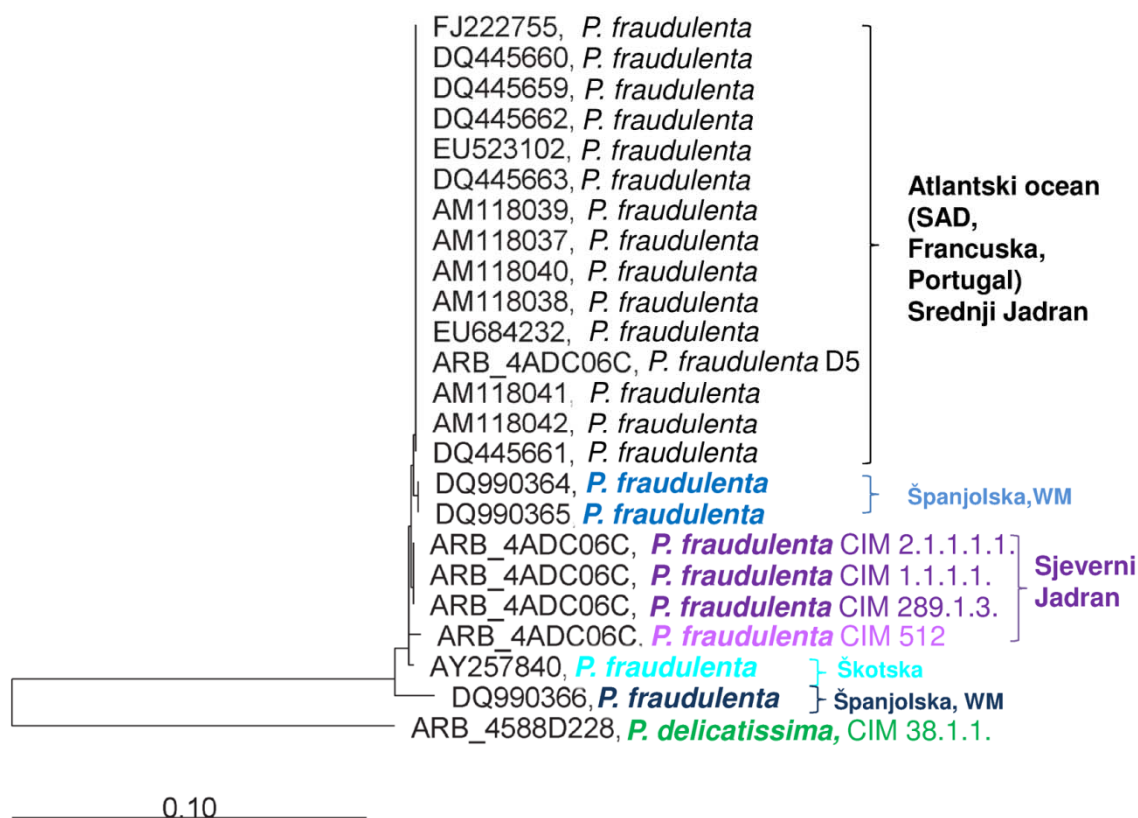


0.10

Slika 4.41. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) prema sekvencama regija ITS1-5,8S-ITS2 dostupnih za vrstu *P. mannii*. Mjerka označava 10 % razliku u stablu. Vrsta *P. fraudulenta* i *P. calliantha* korištene su za «zakorjenjivanje» kladograma.

4.12.2 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Za molekularno određivanje vrste *P. fraudulenta* korištene regije kodirajuće DNA za ribosomsku RNA su: unutarnje transkribirajuće razmaknice regije ITS1, ITS2 i 5,8S rRNA. Sekvence regije ITS1-5,8S-ITS2 omogućuju točno određivanje vrste *P. fraudulenta*. Matrica različitosti (Tablica 4.17.) pokazuje intraspecifičnu različitost manju od 1,9 %, a u isto vrijeme različitost od blisko povezane vrste *P. delicatissima* veća je od 22,1 %.



Slika 4.42. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) prema sekvencama regija ITS1-5,8S-ITS2 dostupnih za vrstu *P. fraudulenta*. Mjerka označava 10 % razliku u stablu. Vrsta *P. delicatissima* korištena je za «zakorjenjivanje» kladograma.

Tablica 4.17. Matrica različitosti vrste *P. fraudulenta* prema sekvencama regije ITS1-5,8S-ITS2 na izolatima iz Atlantskog oceana (SAD-a, Portugala, Francuske), Škotske, Španjolske, zapadnog sredozemlja i Jadrana (sjeverni i srednji). Kratice sekvenci i njihovo geografsko porijeklo nalaze se u kladogramu na slici 4.42.

	FJ222755	DQ445659-63	EU523102	AM118037-42	EU684232	4ADC06C, D5	DQ990364-65	CIM 2.1.1.1.1	CIM 1.1.1.1	CIM 289.1.3	CIM 512	AY257840	DQ990366	CIM 38.1.1
FJ222755	0													
DQ445659-63	0	0												
EU523102	0	0	0											
AM118037-42	0	0	0	0										
EU684232	0	0	0	0	0									
ADC06C, D5	0	0	0	0	0	0								
DQ990364-65	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0							
CIM 2.1.1.1.1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0						
CIM 1.1.1.1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0	0					
CIM 289.1.3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0	0	0				
CIM 512	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0			
AY257840	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0		
DQ990366	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,9	1,7	1,7	1,7	1,9	1,4	0	
CIM 38.1.1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,1	22,3	22	22	22	22,3	22,3	22,7	0

P. delicatissima

Kratice: brojevi kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana započinju oznakom CIM: Brojevi s crticom označavaju sve sekvence koje se nalaze između ta dva broja a korištene su u analizi (npr. **DQ445659-63**)

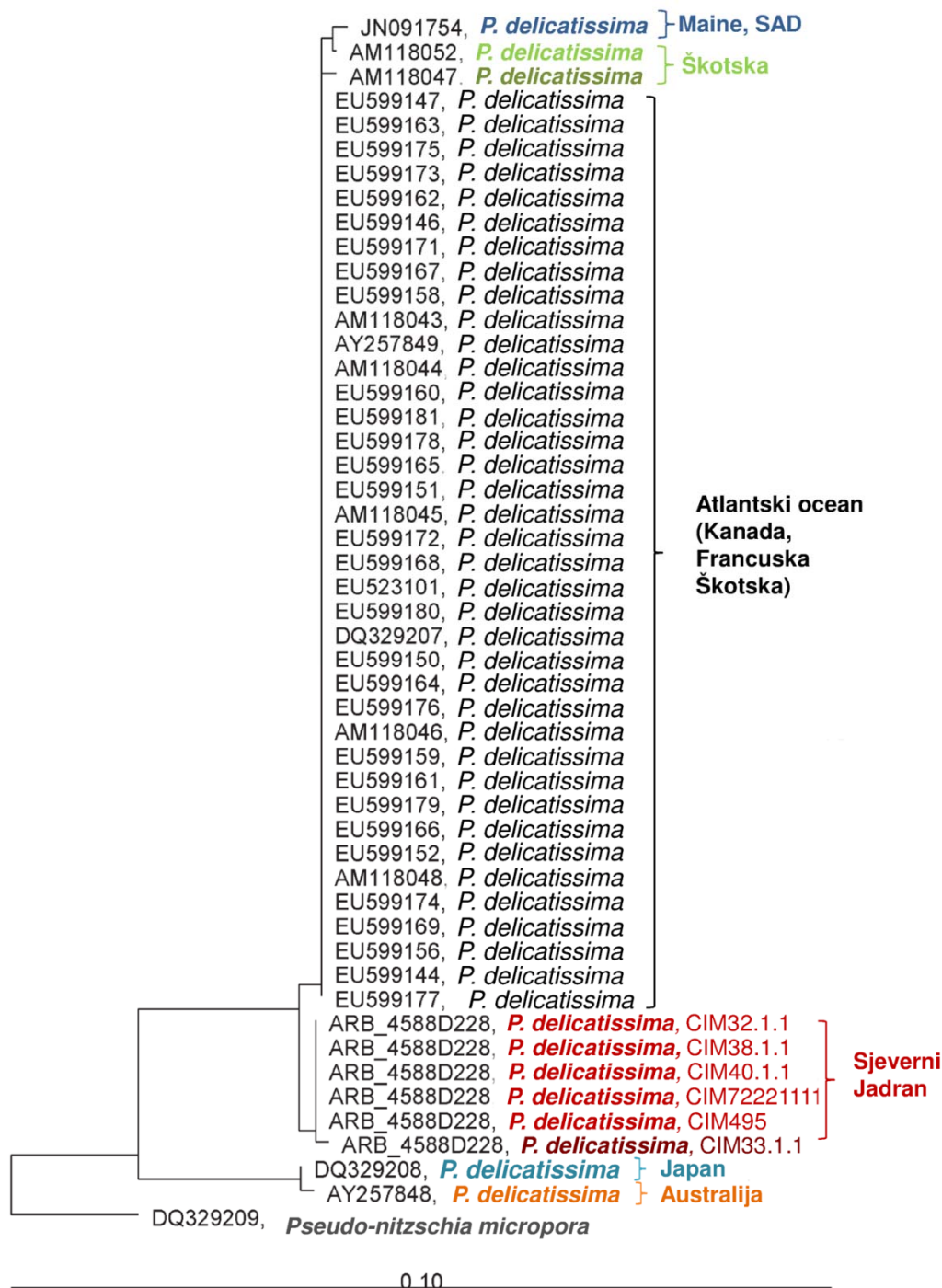
4.12.3 *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*

Za molekularno određivanje vrste *P. delicatissima* korištene regije kodirajuće DNA za ribosomsku RNA su unutarnje transkribirajuće razmaknice regija ITS1, ITS2 i 5,8S rRNA. Sekvence regije ITS1-5,8S-ITS2 omogućuju točno određivanje vrste *P. delicatissima*. Matrica različitosti pokazuje intraspecifičnu različitost manju od 0,8 %, a u isto vrijeme različitost od blisko povezanih vrste *P. micropora* veća je od 5,53 % (Tablica 4.18).

Tablica 4.18. Matrica različitosti vrste *P. delicatissima* prema sekvencama regije ITS1-5,8S-ITS2 na izolatima iz Maina, SAD, Atlantskog oceana (Kanada, Francuska, Škotska), sjevernog Jadrana, Japana i Australije. Kratice sekvenci i njihovo geografsko porijeklo nalaze se u kladogramu na slici 4.43.

	JN091754	AM118052	AM118047	EU599144-181	AY257849	AM118044-45	EU523101	DQ329207	AM118046-48	CIM32.1.1	CIM38.1.1	CIM40.1.1	CIM72211	CIM495	CIM33.1.1	DQ329208	AY257848	DQ329209
JN091754	0																	
AM118052	0,3	0																
AM118047	0,3	0,3	0															
EU599144-181	0,2	0,2	0,2	0														
AY257849	0,2	0,2	0,2	0	0													
AM118044-45	0,2	0,2	0,2	0	0	0												
EU523101	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0											
DQ329207	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0	0										
AM118046-48	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0									
CIM32.1.1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0								
CIM38.1.1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0							
CIM40.1.1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0						
CIM72211	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0					
CIM495	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0	0				
CIM33.1.1	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0			
DQ329208	4,4	4,4	4,4	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	0		
AY257848	4,5	4,5	4,5	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	0,1	0	
DQ329209	5,5	5,5	5,5	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,1	5,2	0

Kratice: brojevi kultura izoliranih iz sjevernog Jadrana započinju CIM; brojevi s crticom označavaju sve sekvence koje se nalaze između ta dva broja, a korištene su u analizi (npr. EU599144-181)

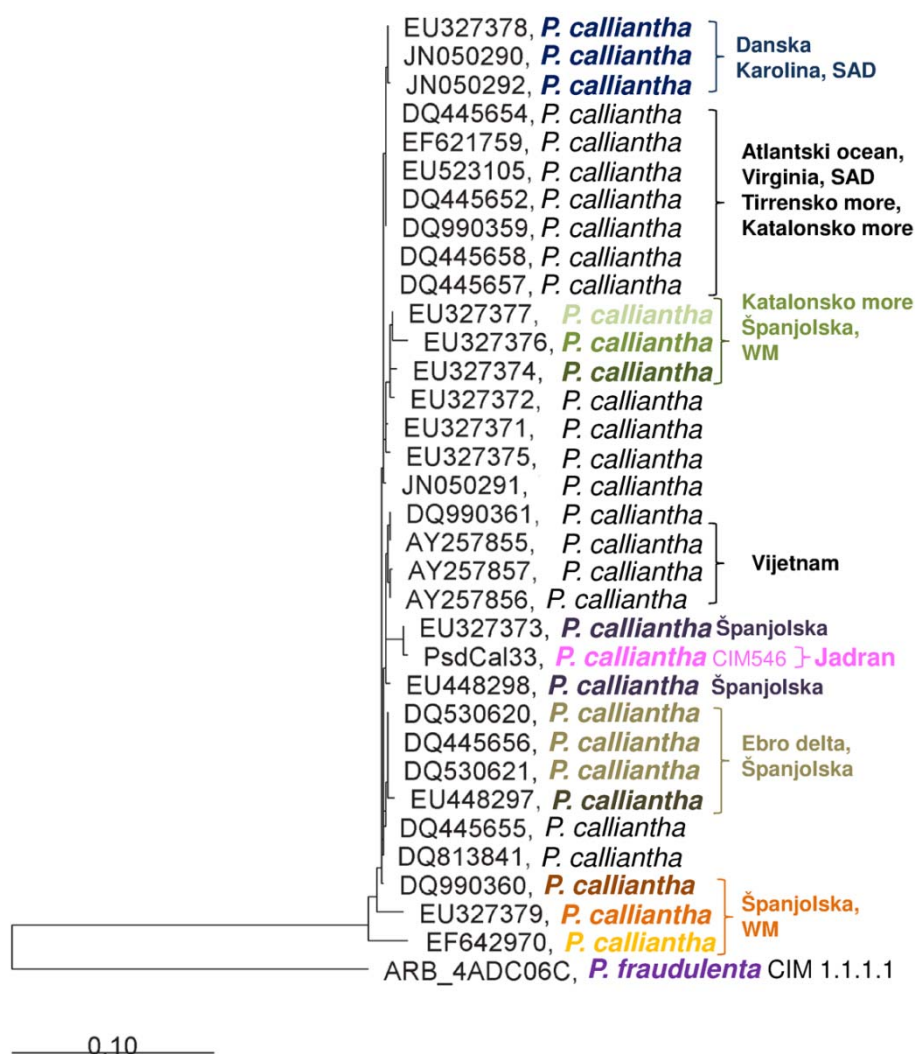


Slika 4.43. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) prema sekvencama regija ITS1-5,8S-ITS2 dostupnih za vrstu *P. delicatissima*. Mjerka označava 10 % razliku u stablu. Vrsta *P. micropora* korištena je za «zakorjenjivanje» kladograma.

4.12.4 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Za molekularno određivanje vrste *P. calliantha* korištene su unutarnje transkribirajuće razmaknice regije ITS1, ITS2 i 5,8S rRNA kodirajuće DNA za ribosomsku RNA.

Sekvence regije ITS1-5,8S-ITS2 omogućuju točno određivanje vrste *P. calliantha*. Matrica različitosti (Tablica 4.19.) pokazuje intraspecifičnu različitost od 0 do 4,3 %, a u isto vrijeme različitost od blisko povezanih vrste *P. fraudulenta* veću od 36 %.

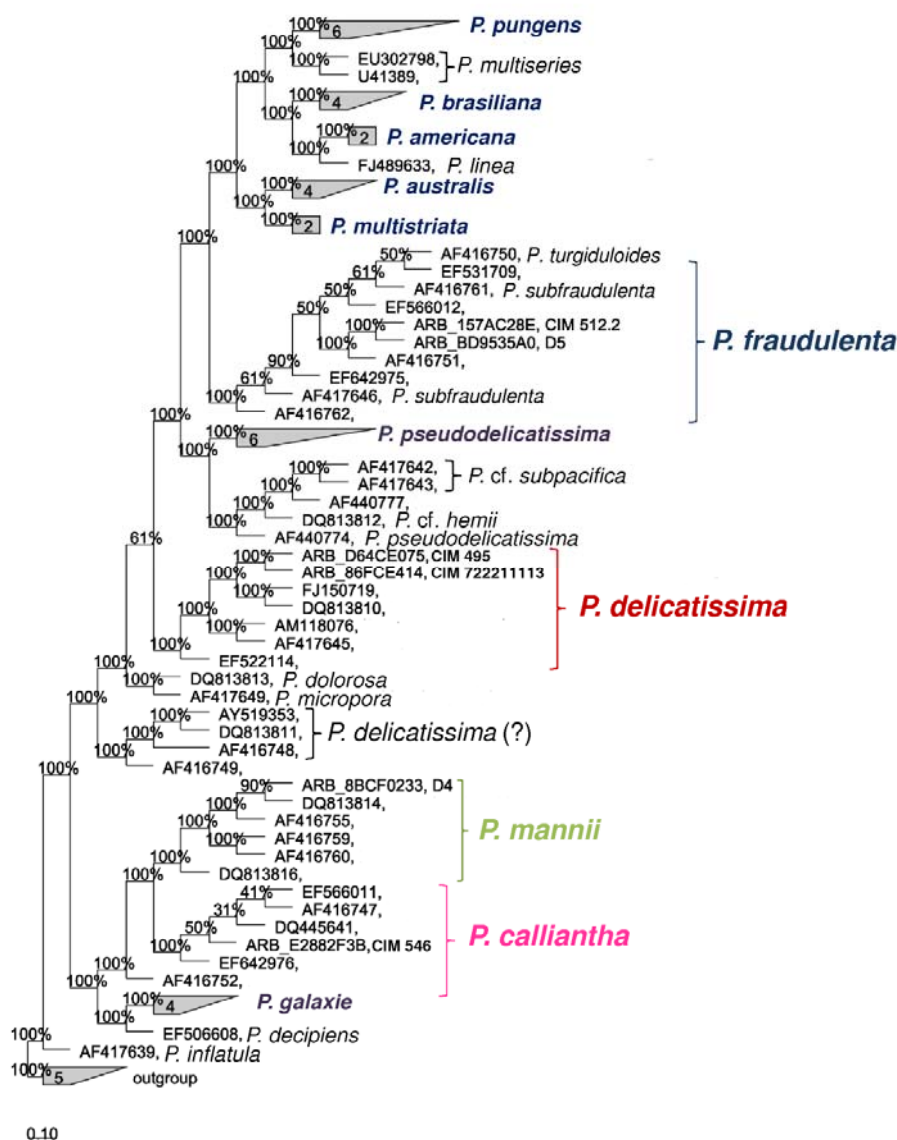


Slika 4.44. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) prema sekvencama regija ITS1-5,8S-ITS2 dostupnih za vrstu *P. calliantha*. Mjerka označava 10 % razliku u stablu. Vrsta *P. fraudulenta* korištena je za «zakorjenjivanje» kladograma.

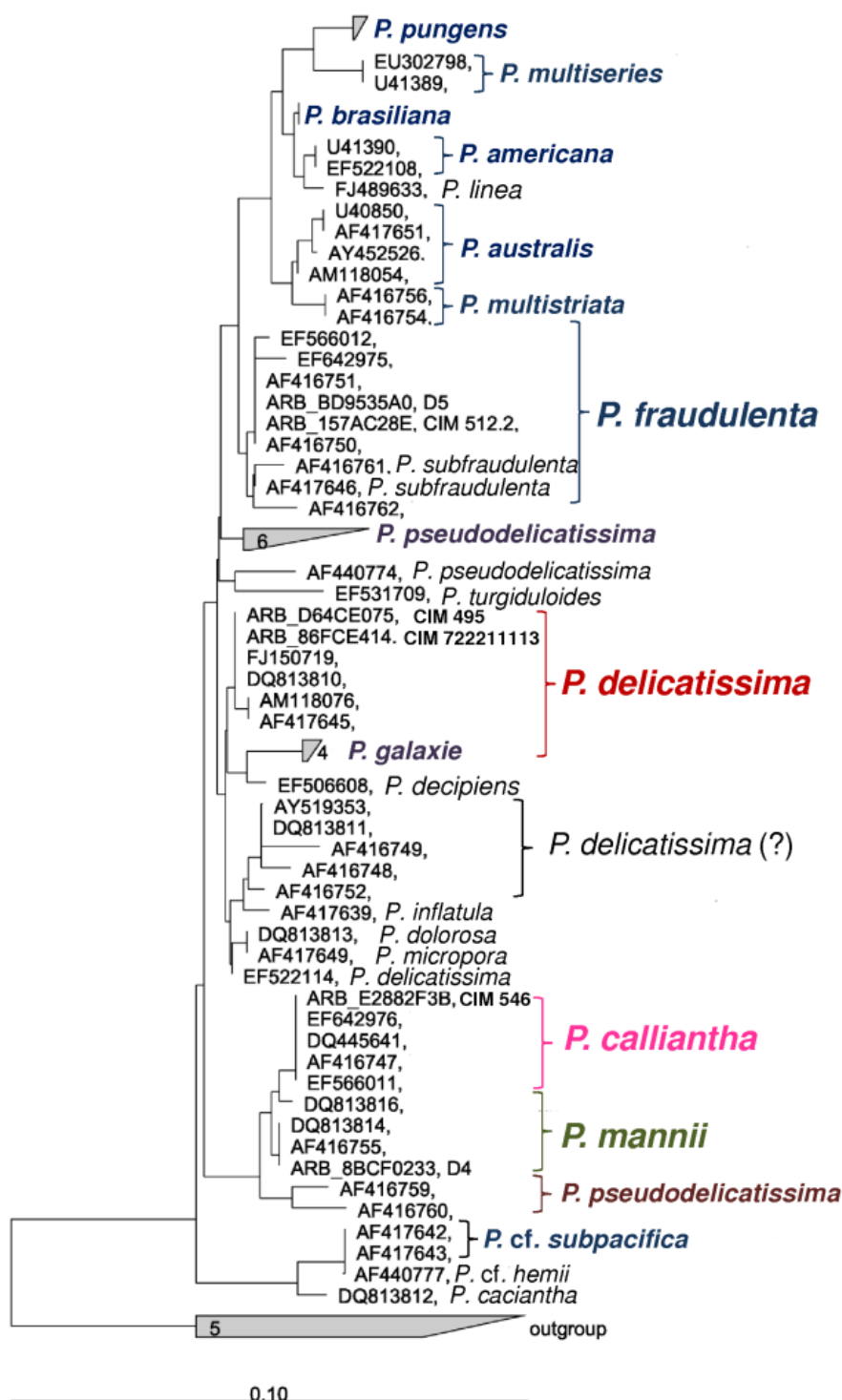
[illegible]

4.13 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE 28S

Za molekularno određivanje vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* i filogeniju korištene su regije D1-D3 velike ribosomske podjedinice kodirajuće DNA za ribosomsku RNA (28S rRNA). Ove regije omogućuju u potpunosti riješeno filogenetsko stablo po metodi maksimalne sličnosti (engl. *maksimalnog likelihood*, ML).



Slika 4.45. Kladogram najizglednije filogenetske rekonstrukcije (*Maximum likelihood analysis*, ML) za regije D1-D3 28S rDNA. Prikazane su bootstrap vrijednosti nakon 1000 iteracija. Stablo je strogi konsenzus 100 najboljih stabala. Brojevi na granama ukazuju na vjerojatnost (u %) kojom se podupire položaj svake grane. Stablo u potpunosti riješeno nema višestrukog grananja.



Slika 4.46. Kladogram dobiven metodom najbližih susjeda (engl. *Neighbour-joining*, NJ) za hipervarijabilnu regiju 28S rDNA. Višestruko grananje prikazuje identične sekvence. Mjerka označava 10 % razliku u stablu.

Analizom ove regije na sakupljenim kulturama različitih vrsta *Pseudo-nitzschia* iz Jadrana potvrđeno je postojanje vrsta *P. fraudulenta*, *P. delicatissima*, *P. calliantha* i

P. mannii, te su uspoređene s postojećim sekvencama u NCBI i provedene filogenetske analize.

Osim za vrstu *P. delicatissima*, u stablu, sve grane se odvajaju s bootstrap vrijednosti od 100 %. Smještanje vrste *P. delicatissima* u stablu podržano je s 61 % bootstrap vrijednosti. Regija 28S rDNA (D1-D3) omogućuje identifikaciju svih do sada poznatih vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* jer tvore bliske skupine u filogenetskoj analizi. Za neke vrste u NCBI-u postoji nekoliko tipova sekvenci za regiju 28S, npr. za vrstu *P. fraudulenta*, ipak svi izolati iz sjevernog Jadrana imali su jednake sekvence.

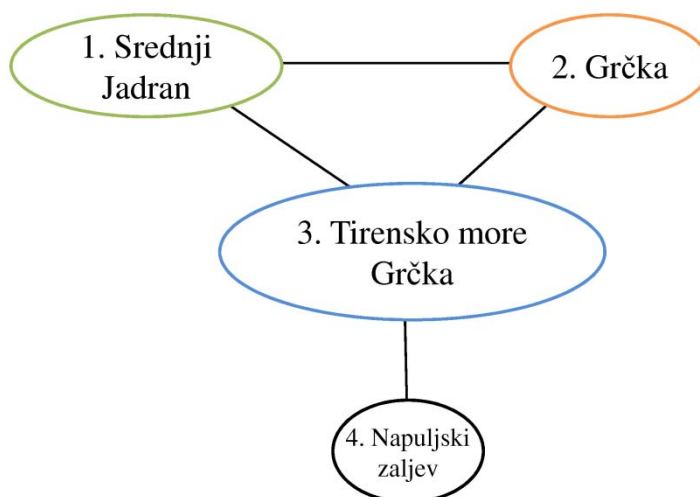
U bazi podataka postoje dva tipa sekvenci i za vrstu *P. delicatissima*, iako se u sjevernom Jadranu ponavlja isti tip (Slike 4.45. i 4.46.). Sve poznate sekvence za vrstu *P. calliantha*, uključujući i one iz sjevernog Jadrana imaju jednak redoslijed nukleotida. Isto vrijedi i za poznate sekvence za vrstu *P. mannii*.

Također, za vrste *P. pungens*, *P. americana*, *P. australis* i *P. pseudodelicatissima* postoji intraspecifična promjenjivost regija D1-D3 regije 28s rDNA.

4.14 ANALIZA POPULACIJA MOLEKULARNIM MARKERIMA

4.14.1 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

Za analizu različitih populacija vrste *P. manni* korištene su unutarnje transkribirajuće razmaknice regija ITS1 i ITS2, uključujući 5,8S rRNA. Na osnovi sekvenci regija ITS1-5,8S-ITS2 pokazuje značajnu razliku između sojeva vrste *P. manni*. Pronašli smo promjenjivost sekvenci do 0,6 % među izolatima iz različitih mora. Taj postotak je dovoljno velik da možemo očekivati da će nam ova regija omogućiti diskriminaciju na razini različitih populacija. Naš skup podataka pokazuje četiri različita tipa ITS-a prikazana u statističkoj analizi parsimonije (SAP, Slika 4.47.). Prvi tip izoliran je u srednjem Jadranu (Telašćica). Drugi tip pronađen je u izolatima iz Grčke tj. Egejskog mora (Slika 4.47.). Treći tip pronađen je u izolatima iz Tirenskog mora, tj. Napuljskog zaljeva i Grčke, a četvrti tip u izolatima Napuljskog zaljeva. Slika 4.47. prikazuje SAP za pronađene tipove ITS-a za vrstu *P. manni*. Prikazani tipovi ITS-a evolucijski su povezani sa sličnošću većom od 95 %. Tip iz Tirenskog mora i Grčke evolucijski su povezani s četvrtim tipom pronađenim u Napuljskom zaljevu. Oba tipa pronađena u grčkim vodama također su evolucijski povezana. ITS tip pronađen u srednjem Jadranu s jednakom evolucijskom sličnosti (udaljenosti) povezan s oba pronađena u grčkim vodama.



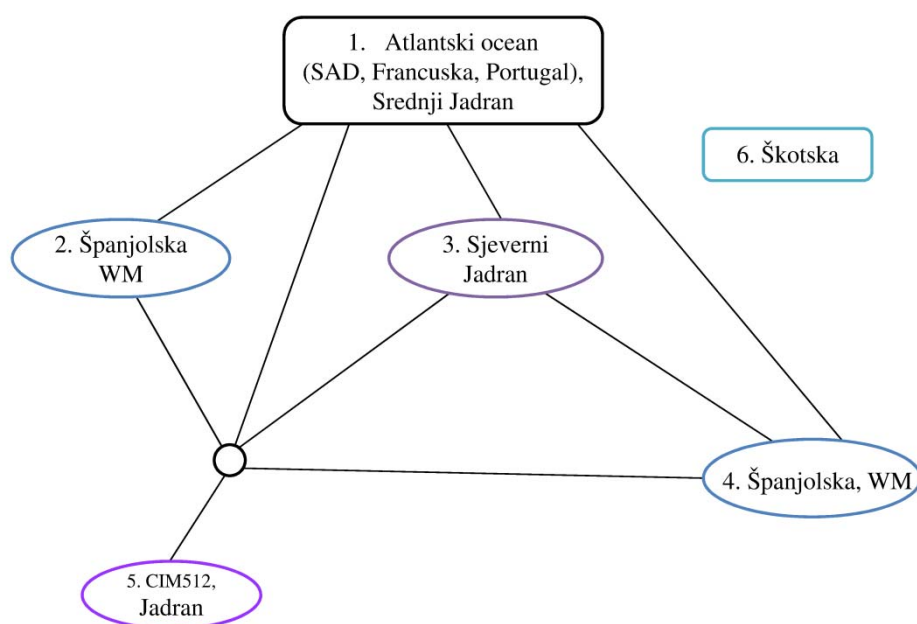
Slika 4.47. Kladogram statističke analize parsimonije (SAP) za različite tipove regije ITS vrste *P. manni*. Boje odgovaraju bojama na slici 4.41. Označeno je odakle izolati potječu.

4.14.2 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Za analizu različitih populacija vrste *P. fraudulenta* korištena je regija ITS1-5,8S-ITS2, tj. unutarnje transkribirajuće razmaknice i 5,8S rRNA.

Na osnovi sekvenci regija ITS1-5,8S-ITS2 pokazuje značajnu razliku između sojeva vrste *P. fraudulenta*. Pronašli smo promjenjivost sekvenci do 1,9 % među izolatima iz različitih mora. Taj je postotak dovoljno velik da možemo očekivati da će nam ova regija omogućiti diskriminaciju na razini različitih populacija. Naš skup podataka pokazuje 6 različitih tipova ITS-a prikazanih u SAP (Slika 4.48.). Prvi tip izoliran je u Atlantskom oceanu (obale SAD-a, Francuska, Portugal) i srednjem Jadranu (Telašćica). Drugi tip pronađen je u izolatima iz Španjolske u Katalonskom moru, tj. u zapadnom Sredozemlju (Slika 4.48.). Treći tip pronađen je u izolatima iz sjevernog Jadrana. Četvrti tip pronađen je u izolatima iz Španjolske, tj. Katalonskog mora i razlikuje se od drugog tipa. Peti tip ponovo dolazi iz sjevernog Jadrana, ali se razlikuje od trećeg tipa. Peti tip ITS-a iz sjevernog Jadrana može biti povezan s ostala četiri tipa, ali nedostaje još jedan među tip da bi statistička vjerojatnost dostigla 95 %. Software je predvidio još jedan korak koji nedostaje, ali u prirodi još uvijek nije pronađen. Šesti tip ITS-a pronađen je u Škotskoj i u SAP analizi pojavljuje se kao zasebna grupa, te ni na koji način nije povezan s ostalih pet pronađenih tipova. Slika 4.48. prikazuje SAP za pronađene tipove ITS-a za vrstu *P. fraudulenta*. Prikazani tipovi ITS-a evolucijski su povezani sa sličnošću većom od 95%.

Tipovi iz Atlantskog oceana, Španjolske i sjevernog Jadrana evolucijski su povezani s vjerojatnošću od 95 % (Slika 4.48.). Oba tipa pronađena u španjolskim vodama nisu izravno evolucijski povezana. ITS tip pronađen u srednjem Jadranu izravno je evolucijski povezan s onim pronađenim u sjevernom Jadranu. Peti tip ITS-a iz sjevernog Jadrana preko karike koja nedostaje indirektno je povezan s dva tipa iz Španjolske, s tipom iz sjevernog Jadrana i tipom iz Atlantskog oceana (Slika 4.48.).



Slika 4.48. Kladogram statističke analize parsimonije (SAP) za različite tipove regije ITS vrste *P. fraudulenta*. Boje odgovaraju bojama na slici 4.42. Označeno je odakle izolati potječu.

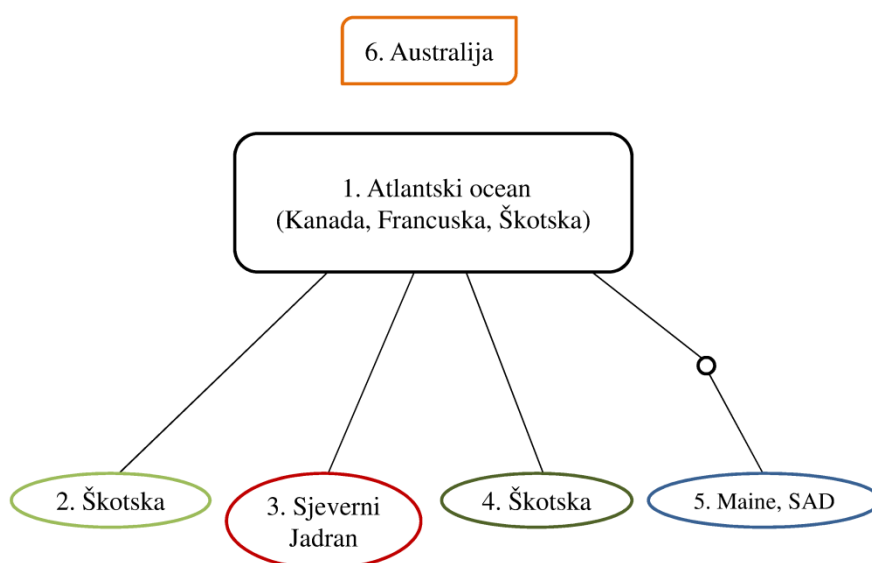
4.14.3 *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*

Za analizu različitih populacija vrste *P. delicatissima* korištena je regija ITS1-5,8S-ITS2, tj. unutarnje transkribirajuće razmaknice i 5,8S r RNA. Na osnovi sekvenci regija ITS1-5,8S-ITS2 pokazuje značajnu razliku između sojeva vrste *P. delicatissima*. Pronašli smo promjenjivost sekvenci do 0,8 % među izolatima iz različitih mora. Taj postotak je dovoljno velik da možemo očekivati da će nam ova regija omogućiti diskriminaciju na razini različitih populacija. Naš skup podataka pokazuje 6 različitih tipova ITS-a prikazanih u SAP-u (Slika 4.49.). Prvi je tip izoliran u Atlantskom oceanu (Kanada, Francuska, Škotska). Drugi tip pronađen je u izolatima iz Škotske. Treći tip pronađen je u izolatima iz sjevernog Jadrana. Četvrti tip pronađen je ponovno u izolatima iz Škotske, ali se razlikuje od drugog tipa i nisu međusobno evolucijski povezani. Peti tip pronađen je u Atlantskom oceanu, tj. Maineu SAD, ali se razlikuje od prvog tipa. Peti tip ITS-a iz sjevernog Jadrana može biti povezan s ostala četiri tipa, ali nedostaje još jedan među tip da bi vjerojatnost dostigla 95 %. Software je predvidio još jedan korak koji nedostaje, ali u prirodi još uvijek nije pronađen. Šesti tip

ITS-a pronađen je u Australiji i u SAP se pojavljuje kao zasebna grupa, te ni na koji način nije povezan s ostalih pet pronađenih tipova ITS-a.

Slika 4.49. prikazuje SAP za pronađene tipove ITS-a za vrstu *P. delicatissima*. Prikazani tipovi ITS-a evolucijski su povezani sa sličnošću većom od 95 %.

Tipovi iz Atlantskog oceana, Škotske i sjevernog Jadrana evolucijski su izravno povezani s vjerojatnošću od 95 %. Oba tipa pronađena u škotskim vodama nisu međusobno izravno evolucijski povezana. ITS tip pronađen u srednjem Jadranu izravno je evolucijski povezan s tipom pronađenim u sjevernom Jadranu.



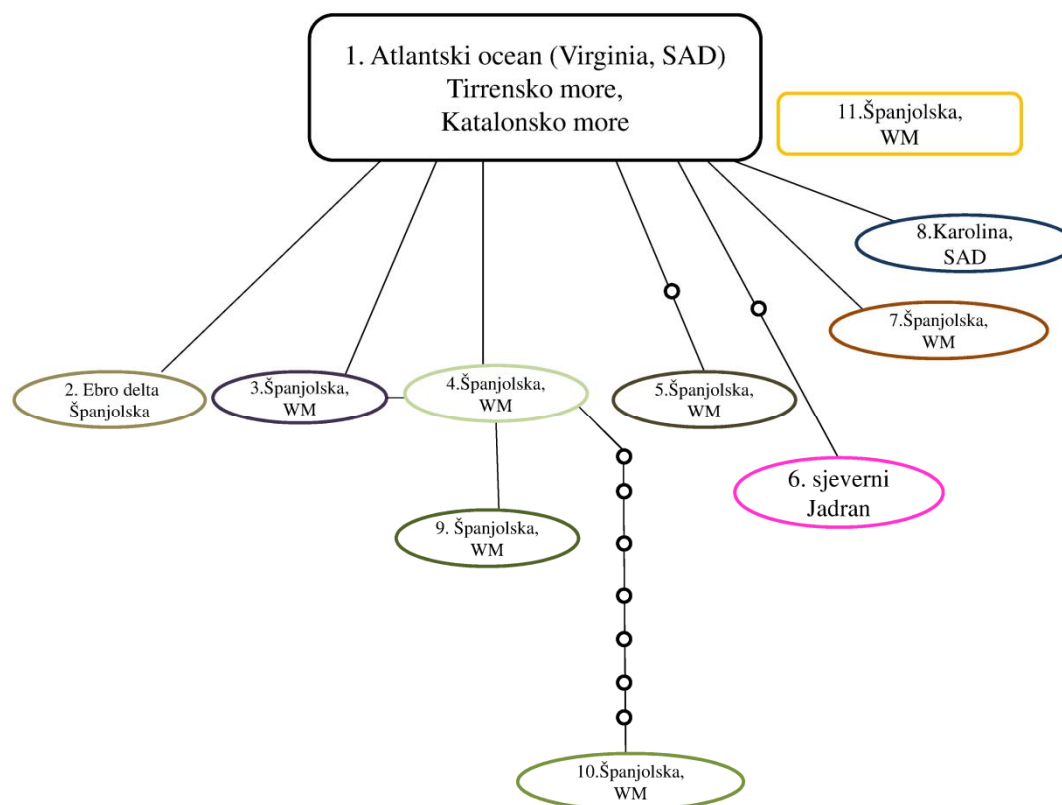
Slika 4.49. Kladogram statističke analize parsimonije (SAP) za različite tipove regije ITS vrste *P. delicatissima*. Boje odgovaraju bojama na slici 4.43. Označeno je odakle izolati potječu.

4.14.4 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Za analizu različitih populacija vrste *P. calliantha* korištene su unutarnje transkribirajuće razmaknice regija ITS1, ITS2 i 5,8S rRNA.

Na osnovi uspoređenih sekvenci regija ITS1-5,8S-ITS2 pokazuje značajnu razliku između sojeva vrste *P. calliantha*. Pronašli smo promjenjivost sekvenci do 4,3 % među izolatima iz različitih mora. Taj postotak je dovoljno velik da možemo očekivati da će nam ova regija omogućiti diskriminaciju na razini različitih populacija. Dostupni skup podataka pokazuje 11 različitih tipova ITS-a prikazanih u SAP-u (Slika 4.50.). Prvi tip izoliran je u Atlantskom oceanu (Virginia, SAD) Tirenskom moru i Španjolskoj (Slika

4.50.). Tipovi od 2.-5., te 7. i 10. pronađeni su u izolatima iz različitih regija Španjolske. Iako svi dolaze iz Španjolske većina njih nije izravno evolucijski povezana, osim trećeg i četvrtog tipa i 4-9. Šesti tip pronađen je u izolatima iz sjevernog Jadrana i indirektno je evolucijski povezan s prvim tipom iz Atlantskog oceana.



Slika 4.50. Kladogram statističke analize parsimonije (SAP) za različite tipove regije ITS vrste *P. calliantha*. Boje odgovaraju bojama na slici 4.44. Označeno je odakle izolati potječu.

Osmi tip ITS-a pronađen je u izolatima iz Karoline, SAD-a i direktno je evolucijski povezan s prvim tipom. Jedanaesti tip ITS-a dolazi također iz Španjolske, ali se razlikuje od svih ostalih tipova u analizi i čini zasebnu grupu.

Slika 4.50. prikazuje SAP za pronađene tipove ITS-a za vrstu *P. delicatissima*. Prikazani tipovi ITS-a evolucijski su povezani sa sličnošću većom od 95 %. Prvi tip iz Atlantskog oceana i sjevernog Jadrana evolucijski su neizravno povezani jer nedostaje još jedna karika u lancu da bi bili povezani s vjerojatnošću od 95 %.

5. RASPRAVA

5 RASPRAVA

Sjeverni Jadran kao relativno mali i plitak bazen pokazuje snažne i brze odgovore na antropogene i prirodne promjene u ekosustavu (Marić i sur., 2012). Tijekom posljednjeg desetljeća dogodile su se značajne promjene u nekim okolišnim parametrima. Vrijednosti saliniteta su porasle poslije 2000. godine i bile su više od prosjeka na obe istraživane postaje (Slike 4.6. i 4.7.). Povišene vrijednosti saliniteta povezane su s smanjenim protokom rijeke Po u kombinaciji s promjenom u kruženju cijelog sjevernog Jadrana. U ovom području obično prevladavajuća anticiklonalno kruženje koje nosi vode rijeke Po obogaćene hranjivim solima prema hrvatskoj obali često je zamijenjena jačom ulaznom strujom vode povišenog saliniteta iz središnjeg Jadrana (EAC). Ta promjena dovodi do značajnog povećanja saliniteta u sjevernom Jadranu posljednjih nekoliko godina na obje istraživane postaje, što je rezultiralo nižom koncentracijom hranjivih soli i nižom primarnom proizvodnjom.

5.1 ODREĐIVANJE RAZDOBLJA

Abundancija i sastav fitoplanktona u sjevernom Jadranu podložni su velikoj prostornoj i vremenskoj promjenjivosti (Bernardi Aubry i sur., 2006). Sjeverni Jadran vrlo je složen ekosustav u kome su prostorna i sezonska raspodjela fitoplanktona pod utjecajem protoka rijeka, i miješanja vodenog stupca (Franco i Michelato, 1992; Harding i sur., 1999). U ovom području često susrećemo visoke N/P omjere, promjenjivost u koncentraciji hranjivih soli i nagle promjene u protoku rijeke Po i sve to utječe na prostornu i vremensku raspodjelu fitoplanktona. Iako postoji izrazito visoka promjenjivost fitoplanktonske zajednice ona se isključivo odnosi na abundanciju fitoplanktona, a rjeđe na sastav zajednice (Bernardi Aubry i sur., 2006).

Mozetić i sur. (2010) uočili su značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* posljednjih godina i to su povezali s oligotrofikacijom sjevernog Jadrana koji se tradicionalno smatralo jednim od najproduktivnijih područja Sredozemlja (Sournia, 1973; Degobbi i sur., 2000). Zanchettin i sur. (2008) predlažu da su protoci rijeka dobar pokazatelj za procjenu promjenjivosti sjevernog Jadrana kao odgovora na klimatske i antropogene promjene na godišnjim i višegodišnjim vremenskim skalama, te bi primijećeno

smanjenje protoka rijeka moglo biti povezano s promjenama na globalnoj skali. Njihovi rezultati se slažu s Ludwigom i sur. (2009) koji su dokumentirali značajno smanjenje protoka mnogih sredozemnih rijeka u razdoblju od 1960. do 2000., uključujući i negativni trend protoka rijeke Po posljednjih 30 godina (Cozzi i Giani, 2011).

Budući da iz višegodišnje vremenske raspodjele fitoplanktona nismo uvidjeli značajne trendove u promjenjivosti abundancije, analizirajući promjenu saliniteta, kao direktnog pokazatelja protoka rijeka, pokušali smo odrediti razdoblja u kojima su se dogodile eventualne promjene koje su utjecale na abundanciju fitoplanktona.

Analiza saliniteta na postajama RV001 i SJ107 ukazuje na pomak sustava oko 1999/2000., te je ta godina određena kao prijelomna u čitavom istraživanom razdoblju. Povećanje saliniteta nakon 2000. godine i smanjen protok rijeke Soče zabilježili su i Mozetič i sur. (2012) u Tršćanskom zaljevu, što se odrazilo na smanjenje abundancije fitoplanktona, dijatomeja i zooplanktona u godinama koje su uslijedile.

5.2 SUSTAVNI POMACI U ABUNDANCIJI FITOPLANKTONA

Prema definiciji prijelomno razdoblje ili pomak sustava (engl. *Regime shift* RS) je nagla promjena broja fizičkih svojstava i varijabli ekosustava koja dovodi do novih uvjeta ili novog režima u sustavu (Conversi i sur., 2010). Najnovija istraživanja usredotočena su na promjene u ekosustavu, bioraznolikosti i djelovanje ekosustava i spleta promjena (Kamburska i Fonda-Umani, 2009; Conversi i sur., 2010).

Pomak sustava, uočen u abundanciji fitoplanktona (Slika 4.8.) u obalnom dijelu sjevernog Jadrana, pokazao je nekoliko lančanih promjena. Prvo razdoblje karakterizirano je povećanjem abundancije u osamdesetima, tj. uzlaznim trendom ukupne abundancije fitoplanktona, dijatomeja, dinoflagelata, mikroplanktona i nanofitoplanktona na obje istraživane postaje. Pomaci su izraženiji na postaji SJ107 u odnosu na RV001 (1984), tj. promjene na SJ107 prethodile su promjenama na postaji bliže obali (1988). Conversi i sur. (2010) pokazali su da je Sredozemno more prošlo kroz jedan sustavni pomak krajem 1980-tih godina. Pomak sustava (engl. *Regime shift* RS) je zahvatio cijeli ekosustav, a promjene su se dogodile u atmosferskim, hidrološkim

i biološkim parametrima. Promjene u fitoplanktonu utjecale su na zooplankton i više karike trofičkog lanca.

Iako je u ovom istraživanju korištena neznatno preinačena metoda (software je bio drugačije podešen, *cut-off lenght* = 10 godina), zabilježeni su slični rezultati, posebice za postaju RV001. Civitarese i sur. (2010) ukazuju na promjenu cirkulacije (s anticiklonalnog u ciklonalni vrtlog) u Jonskom moru, što je posredno utjecalo na proizvodnju i bioraznolikost Jadranskog mora. Opažena promjena u salinitetu 2000. godine doprinijela je u smanjenju abundancije ukupnog fitoplanktona u drugom razdoblju. Abundancija dinoflagelata nije se značajnije promijenila osim neznatnog smanjenja u drugom istraživanom razdoblju. Abundancija mikrop planktona, kojim dominiraju dijatomeje, na račun promjena krajem osamdesetih se povećala od 1988. do 1992. Od tada je opažen neznatni pad dijatomeja prema drugom razdoblju. Ovo je u skladu s rezultatima Mozetič i sur. (2012), koji su zabilježili značajno smanjenje obilnih cvjetanja dijatomeja u razdoblju od 1999-2003. i značajno nižu njihovu abundanciju u razdoblju nakon 2003. godine u Tršćanskom zaljevu. Oni su analizu prijelomnih razdoblja proveli na velikom setu podataka koji je obuhvatio abiotičke (protok rijeka, salinitet, hranjive soli) i biološke čimbenike (fitoplankton i zooplankton), većina njih imala je pomak sustava između 1999. i 2003., te su izabrali 2002/2003 godinu kao godinu kada je ekosustav promijenio režim. U našem slučaju analiza prijelomnih razdoblja provedena je na salinitetu i abundancijama grupa fitoplanktona. Najizraženija promjena dogodila se u abundanciji nanofitoplanktona koji se prikazanim podacima smanjio što je u suprotnosti s onim što su opazili Mozetič i sur. (2012). Naime, u Tršćanskom zaljevu količina nanofitoplanktona se udvostručila nakon 2003. godine. To je bilo za očekivati zbog smanjenja abundancije i veličine ukupnog fitoplanktona i dijatomeja u cijelom tršćanskom bazenu i prelazu prema manjim vrstama. Stoga se ovi rezultati za nanofitoplankton pogotovo na oligotrofnijoj postaji RV001 nikako ne uklapaju s Mozetič i sur. (2012). Moguće da je razlog opaženom smanjenju nanofitoplanktona u korištenoj metodologiji, tj. u fiksativu. Naime uzorci su fiksirani lugolom za kojeg je poznato da zbog svoje kiselosti otapa stanice kokolitoforida i malih flagelata pa bi to moglo biti jedno od objašnjenja zašto je broj stanica manji u drugom istraživanom razdoblju. Mozetič i sur. (2012) zabilježili su također smanjenje

abundancije mikrozooplanktona u razdoblju od 2000. do 2003. koji je reagirao na nedostatak hranjivih soli i smanjenje fitoplanktona u sustavu.

5.3 KORELACIJE FITOPLANKTONA I OKOLIŠNIH PARAMETARA – PCA

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*-PCA; Tablice 4.3 i 4.4) provedena je radi razumijevanja odnosa okolišnih parametara i fitoplanktona. Rezultati su pokazali značajnu korelaciju između saliniteta i abundancije fitoplanktona. Najznačajnija cvjetanja dogodila su se pri sniženim salinitetima. Slične rezultate pronašli su Bernardi Aubry i sur. (2004). Prva komponenta (PC1) bila je vezana uz protok rijeka u obalnim ekosustavima, s obrazloženjem da je prostorna raspodjela hranjivih tvari tijesno vezana uz protoke rijeka, a time i saliniteta. U našem slučaju, značajna korelacija s niskim salinitetom može se objasniti povećanom koncentracijom hranjivih soli u vodama niskog saliniteta podrijetlom iz rijeke Po i potvrđuje da se povećanje saliniteta poklopilo sa smanjenjem abundancije fitoplanktona nakon 2000. godine. Voda nižeg saliniteta na postaji SJ107 uglavnom dolazi anticiklonalnim sustavom cirkulacije, što dokazuje pojačana Istarska protustruja (ICCC), dok niski salinitet na postaji RV001 može biti posljedica u promjenama intenziteta obalnih struja (Supić i sur., 2001).

Značajne korelacije koncentracije pojedinih hranjivih soli i abundancije fitoplanktona ukazuju na njihovu ulogu u ograničavanju rasta fitoplanktona, dok hranjive soli koje nisu u korelaciji vjerojatno ne ograničavaju rast fitoplanktona. Smanjenje dostupnosti ortofosfata moglo se uočiti od postaje SJ107 prema postaji RV001, što se može objasniti i slabijim utjecajem rijeke Po i iscrpljenosti hranjivih soli prema istarskoj obali.

U sjevernom Jadranu rast fitoplanktona ograničen je koncentracijom ortofosfata (Degobbis i sur., 2000). Manjak fosfora fitoplankton može prevladati korištenjem alkalne fosfataze, enzima koji stanicama omogućuje korištenje organskog fosfora kao njegovog izvora u prilikama kada ga nedostaje u ekosustavu (Ivančić i sur., 2009). Negativna korelacija s nitratima ukazuju na povećanje nitrata i nisku abundanciju

fitoplanktona, skoro za gotovo cijelo razdoblje od 2000. do 2009. Veće količine nitrata akumuliraju u ekosustavu i ostaju neiskorištene zbog nedostatka fosfora. To doprinosi dodatnom nakupljanju nitrata u ekosustavu.

Tijekom cijelog istraživanih razdoblja iznimno visoke abundancije dijatomeja i dinoflagelata zabilježene su u nekoliko navrata (na primjer cvjetanje dijatomeja u listopadu 1993. i veljači 2004., što se odrazilo na ukupnu abundanciju mikro- i ukupnog fitoplanktona; Slika 4.9. i 4.10.). Ovi događaji su utjecali na povećanje srednjih vrijednosti abundancije (Slika 4.10.), što se vidi kao razlika između srednjaka i vrijednosti medijana skupa s visokom standardnom devijacijom. Iako su povišene abundancije tijekom cvjetanja fitoplanktona u veljači i listopadu uobičajene ipak tako visoke abundancije su iznimno rijetke. Pretpostavka je da su takva iznimno bogata cvjetanja rezultat posebno povoljne kombinacije okolišnih uvjeta.

5.4 POMACI U SEZONSKOJ RASPODJELI FITOPLANKTONA

Ukupni fitoplankton je zbroj mikrofitoplanktonske i nanofitoplanktonske frakcije, s većim udjelom nanofitoplanktona na ukupnu abundanciju u sjevernom Jadranu. Dijatomeje čine glavninu mikropilanktona i predstavljaju najveći dio ukupne biomase u sjevernom Jadranu (Revelante i Gilmartin, 1976a). Značajno povećanje abundancije dijatomeja uočava se u područjima nižeg saliniteta. Slične rezultate pronašli su Bernardi Aubry i sur. (2006) uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana gdje dijatomeje dominiraju mikro- i nanofrakcijom tijekom većeg dijela godine. Dinoflagelati imaju važnu ulogu u bioraznolikosti fitoplanktonske zajednice u razdoblju raslojenosti vodenog stupca (Bernardi Aubry i sur. 2004; 2006). Ali je njihova važnost u ukupnoj abundanciji fitoplanktonske zajednice općenito niska, a povećanu abundanciju dostižu u ljetnim mjesecima, od lipnja do srpnja, nakon što je proljetno cvjetanje dijatomeja iscrpilo hranjive soli. Primijećene su i promjene u abundanciji fitoplanktona tijekom sezonskih ciklusa. Viličić i sur. (2009) uočili su pomak najviše godišnje abundancije fitoplanktona u sjevernom Jadranu, s proljetnog na jesensko razdoblje u razdoblju od 2005-2007. godine.

Mozetič i sur. (2010), napomenuli su da se u posljednjem desetljeću najveće koncentracije klorofila *a* pomaknule sa siječnja-veljače na travanj-svibanj, značajnije na zapadnim postajama koje su najviše pogođene smanjenim protokom rijeke Po. Osim toga, neka od redovnih cvjetanja fitoplanktona čini se da su gotovo izostala u drugom istraživanom razdoblju, npr. zimsko-ranoproljetno cvjetanje dijatomeja i mikrop planktona na postaji RV001 ili proljetno cvjetanje nanofitoplanktona na postaji SJ107. Iz naših podataka vidljivo je da se proljetno cvjetanje pomaknulo na ljetno razdoblje. Bliske vrijednosti medijana i srednje vrijednosti potvrđuju da na srednju vrijednost nisu značajno utjecala izolirana cvjetanja. Pojavu ljetnog cvjetanja dijatomeja zabilježili su Mozetič i sur. (2012) u tršćanskom zaljevu gdje su zabilježene visoke abundancije dijatomeja iz roda *Chaetoceros* spp. i *Proboscia alata*. Oni smatraju da su ova cvjetanja potaknuta meteorološkom situacijom u ljetnim mjesecima (2005., 2008., 2009.) kada je zabilježena značajnija količina padalina, a time i povećan donos hranjivih soli. Već je ranije dokazano da fitoplankton, a posebice dijatomeje, reagiraju brzo na ljetne oluje koje donose hranjive soli u površinski sloj (Malej i sur., 1997).

U prvom istraživanom razdoblju većina zimskih cvjetanja s visokim abundancijama bila je povezana s dominacijom malih dijatomeja poput vrste *Skeletonema marinoi* (Harding i sur., 1999; Bernardi Aubry i sur., 2006). Druga istraživanja za sjeverni Jadran posljednjih godina navode da su prvim sezonskim cvjetanjem dominirali mali autotrofni nanoflagelati ili dijatomeja *Cerataulina pelagica* (Socal i sur., 2008) i mali dinoflagelati, npr. *Prorocentrum minimum* (Bernardi Aubry i sur., 2006). Budući da ranoproljetno cvjetanje ovisi o regeneriranim hranjivim solima koje na površinu dolaze miješanjem vodenog stupca Mozetič i sur. (2010) predložili su da bi smanjenje intenziteta proljetnog cvjetanja moglo biti povezano s oligotrofikacijom u sjevernom Jadranu.

5.5 SASTAV ZAJEDNICE I INDEKSI RAZNOLIKOSTI

Usporedbom broja vrsta određenih u prvom i drugom razdoblju primijećene su određene promjene na obje istraživane postaje (npr. na postaji SJ107 određene su 222 vrste u prvom istraživanom razdoblju i 170 vrsta u drugom). Budući su se razdoblja razlikovala u trajanju najbolji način da se provjeri da li je uistinu došlo do promjene broja vrsta unutar zajednice bilo je usporedbom indeksa raznolikosti i indeksa obilja vrsta. Ti indeksi mogu biti korisni pokazatelj trofičkog stanja ekosustava, a u mnogim slučajevima oni su bolji pokazatelji od samih kemijskih svojstava vodenog stupca (Revelante i Gilmartin, 1980). Za istraživane postaje (RV001 i SJ107) uspoređeni su indeksi raznolikosti i obilja na godišnjoj (Slike 4.12 i 4.13.) i mjesečnoj razini (Slika 4.14.). Indeks raznolikosti vrsta i indeks obilja visoki su i stabilni na obje postaje kroz čitavo istraživano razdoblje. Visoke indekse raznolikosti na istočnoj obali Jadrana zabilježili su i Revelante i Gilmartin (1980), a najviša raznolikost zabilježena je u mjesecima od rujna do prosinca tijekom trajanja jesenskog cvjetanja dijatomeja, što potvrđuju i naši rezultati (Slika 4.14.).

Na slikama 4.12. i 4.13. na postaji SJ107 strelicom su označene najviše vrijednosti, a one su izmjerene 1973. godine kada je učestalost uzorkovanja bila najviša u čitavom istraživanom razdoblju, tj. svaka 2 tjedna. To bi mogao biti razlog za najviše vrijednosti indeksa raznolikosti i obilja.

Sustavni pomak (RS) otkriven u abundanciji fitoplanktona i okolišnim parametrima nije utjecao na bioraznolikost vrsta. Podatci ukazuju na određenu pojavu koja bi mogla biti povezana s promjenom u sustavu cirkulacije koju su opisali Civitarese i sur. (2010). Oni su uočili promjenu u smjeru cirkulacije (vrtloga) u Jonskom moru koji kontrolira struje. EAC na svom putu donosi vrlo raznoliku i bogatu fitoplanktonsku zajednicu koja je karakteristična za oligotrofna područja. Povećane vrijednosti indeksa bioraznolikosti ukazuju na to da je ovo područje važno u pogledu bioraznolikosti fitoplanktona i vjerojatnije je da ćemo dominantne vrste naći unutar bogate fitoplanktonske zajednice koje pridonose bioraznolikosti zajednice kao što su opisali Gravel i sur. (2011). Ipak trebamo imati na umu da je svaka vrsta jedinstvena i parametri važni za rast i napredovanje jednog organizma ne moraju nužno vrijediti i za ostale organizme (Martin, 2009). Vrste roda *Pseudo-nitzschia* dominirale su fitoplanktonskom

zajednicom u cijelom istraživanom razdoblju, a nakon 2000. godine zabilježeno je još češće pojavljivanje ovog roda. Godišnji ciklus grupe *Pseudo-nitzschia delicatissima* ima dva izražena maksimuma, proljetni i jesenski. Na postajama bliže rijeci Po (SJ101, SJ107) grupa *P. delicatissima* dostiže svoje najviše abundancije u ožujku dok je na postaji RV001 proljetno cvjetanje zabilježeno nešto kasnije u razdoblju od travnja do svibnja. Jesensko cvjetanje obično započinje u rujnu i traje do listopada. Grupa *P. delicatissima* prisutna je u niskim abundancijama tijekom čitave godinu što doprinosi povećanju učestalosti pojavljivanja ove grupe u posljednjim godinama. Iako je očekivano da određene vrste prate godišnju raspodjelu pronađene su genetički iste vrste i populacije u proljetnom i jesenskom cvjetanju za vrste *P. delicatissima* i *P. fraudulenta* (Tablica 4.15.) na različitim postajama i godinama.

Godišnji ciklus grupe *Pseudo-nitzschia seriata* također ima dva godišnja maksimuma kada se pojavljuju povišene abundancije. Rano cvjetanje koje započinje već u zimskim mjesecima (siječanj-veljača) i u jesen (rujan-listopad, Slika 4.27.).

Također, povremeno su zabilježene i povišene vrijednosti u pridnom sloju tijekom ljetnih mjeseci kada je vođeni stupac raslojen.

U sjevernom Jadranu uočene su promjene u ispitivanom periodu od 1972-2009. u sastavu vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*, prvenstveno se odnosi na smanjenje učestalosti pojavljivanja grupe *P. seriata* i povećanje učestalosti pojavljivanja grupe *P. delicatissima* (do 82,1 %) na obje istraživane postaje nakon 2000. godine.

Slične rezultate zabilježili su Lundholm i sur. (2010) u jednom zaljevu u Danskoj kada su rekonstruirali promjene sastava vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia* tijekom posljednjih 100 godina. Analizirali su sediment i odredili koje su se vrste izmjenjivale u zaljevu. Zaključili su da je do 1947. godine najbrojnija i najzastupljenija bila *P. multiseriata* koju je kasnije zamijenila *P. pungens*. Pretpostavlja se da je promjena u zajednici bila potaknuta povišenim koncentracijama nitrata u tom razdoblju. Uočili su i pojavu novih vrsta *P. hemii*, *P. americana* i *P. pseudodelicatissima* što su povezali s porastom temperature posljednjih godina. Važno je napomenuti da raznolikost često može biti prikrivena kada su stanice prisutne u malom broju ili nije moguće razlikovati vrste (Horner i sur., 1997). Vrste iz roda *Pseudo-nitzschia* imaju veliki raspon fizioloških prilagodbi i time dokazuju svoju sposobnost da dominiraju u različitim okolišnim uvjetima (Bates i sur., 1998) na što ukazuju i ovi podatci.

U posljednje vrijeme postoji povećani interes za točno određivanje vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia* budući da su neke vrste potencijalno toksične, te imaju mogućnost sinteze domoične kiseline. *P. calliantha* dominirala je u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana, a nakon cvjetanja ove vrste pronađena je i DK u tkivu prirodnih populacija školjkaša (Marić i sur., 2011).

Skeletonema marinoi jedna je od rijetkih dijatomeja čija se prosječna abundancija povećala u drugom istraživanom razdoblju na postaji SJ107, dok se na postaji RV001 smanjila. *S. marinoi* se obično pojavljuje u rano proljeće na zapadnoj strani sjevernog Jadrana, a na njegovoj istočnoj se pojavljuje sporadično. *Skeletonema* dobro raste u vodi s povišenom koncentracijom hranjivih soli antropogenog podrijetla. Izuzetno brzo apsorbira veće koncentracije nitrata što se odražava i na njenu stopu rasta (DeManche i sur., 1979). U usporedbi s ostalim dijatomejama *Skeletonema* je bolji kompetitor u sličnim okolišnim uvjetima.

U sjevernom Jadranu povećala se i učestalost pojavljivanja različitih vrsta roda *Chaetoceros* posljednjih 10 godina. O sličnim rezultatima pišu Mozetić i sur. (2010) koji su uočili da je rod *Chaetoceros* mnogo učestaliji u rano proljeće u tršćanskom zaljevu posljednjih godina nego devedesetih prošlog stoljeća.

Ove male kolonijalne dijatomeje iz roda *Chaetoceros* spp. imaju povoljniji omjer površine i volumena i bolje rastu pri niskim koncentracijama hranjivih soli i visokom N:P omjeru (Lagus i sur., 2004). To je vjerojatno i bio slučaj u obalnim vodama sjevernog Jadrana u drugom istraživanom razdoblju.

Još 1998. Mozetić i sur. (1998) navode da najviše godišnje abundancije fitoplanktona uglavnom ovise o oportunističkim, brzorastućim vrstama dijatomeja poput *Skeletonema costatum* (*S. marinoi*), *P. pseudodelicatissima*, *Chaetoceros* spp., *Cyclotella* spp. i *Cylindrotheca closterium*. Čini se da ove vrste brzo reagiraju na dostupne koncentracije hranjivih soli koje su donesene rijekama ili kišom (Mozetić i sur., 1998).

Broj dinoflagelata bio je veći u svibnju i kolovozu, u pravilu nakon što hranjive soli bile istrošene tijekom cvjetanja dijatomeja. *Prorocentrum* spp., *Ceratium* spp., *Gyrodinium* spp., *Gymnodinium* spp. i *Protoperidinium* spp. bili su najčešći i najbogatiji rodovi dinoflagelata tijekom istraživanog razdoblja, što je u skladu s prethodnim opažanjima (Bernardi Aubry i sur., 2004; Viličić i sur., 2009).

Pojava vrsta iz rodova kao što *Protoperidinium* spp. i *Gyrodinium* spp. u proljetnim i ljetnim mjesecima vjerojatno je odgovor na povećanje broja dijatomeja, jer su one dobar izvor hrane za neke heterotrofne vrste dinoflagelata (Stelfox-Widdicombe i sur., 2004).

5.6 EKOLOGIJA I DINAMIKA CVJETANJA RODA

PSEUDO-NITZSCHIA

Rod *Pseudo-nitzschia* je široko rasprostranjen u svim morima i oceanima premda postoje tropske, polarne, pelagičke i neritičke vrste (Hasle, 2002). Cvjetanja vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pojavljuju se relativno često, u nekim dijelovima svijeta, gotovo sezonski.

U sjevernom Jadranu dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* prisutne su tijekom čitave godine i često dostižu visoku abundanciju, a uočena je određena sezonalnost u raspodjeli njihove abundancije. Grupa *P. delicatissima* ima dva izraženija cvjetanja, proljetno i jesensko. Najveće abundancije zabilježene su od ožujka do lipnja i tijekom jesenskih mjeseci u rujnu i listopadu. Mali broj stanica vrsta iz grupe *P. delicatissima* prisutan je s niskom abundancijom kroz čitavu godinu što doprinosi povećanju učestalosti pojavljivanja ove grupe. Sezonska raspodjela abundancije grupe *P. seriata* također ima dva izražena cvjetanja: prvo započinje već u zimskim mjesecima (siječanj-veljača), a drugo u jesen (rujan, listopad).

Iz literature je poznato da prirodne populacije različitih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* mogu živjeti pri velikom rasponu saliniteta i temperature, te obično koreliraju s različitim ekološkim čimbenicima (Lelong i sur., 2012; Trainer i sur., 2012).

P. pungens je vrsta pronađena u širokom rasponu saliniteta i temperature i smatra se kozmopolitskom vrstom. U sjevernom Jadranu *P. pungens* se pojavljuje u zimskim mjesecima i ima izraženu sezonalnost (Ljubešić i sur., 2011; Penna i sur., 2013).

Vrste *P. pseudodelicatissima* i *P. fraudulenta* uočene su u obalnim vodama i oceanima, tropskim i umjerenim područjima diljem svijeta pa je njihov pronalazak u sjevernom Jadranu bio očekivan.

Vrste *P. calliantha* i *P. delicatissima* zabilježene su u tropskim i umjerenim obalnim vodama (Trainer i sur., 2012), a redovito ih pronalazimo i u Jadranu. *P. calliantha* u

sjevernom Jadranu je pod utjecajem temperature što je zabilježeno i u zapadnom Sredozemlju (Marić i sur., 2011; Trainer i sur., 2012), te je tako viša abundancija zabilježena u toplijem djelu godine, u kasno ljeto i jesen.

P. subfraudulenta je obalna vrsta koja preferira povišene temperature vode što je u skladu s pronalaskom u Jadranu.

Mnoge vrste mogu koegzistirati, ali različite stope rasta i predacije mogu dovesti do složene dinamike cvjetanja te naglasiti sezonsku sukcesiju vrsta unutar roda.

Neka od cvjetanja uočena u sjevernom Jadranu bila su dominirana samo jednom vrstom, npr. cvjetanje vrste *P. calliantha*, 2007., dok smo 2008. godine imali cvjetanje u kojemu su koegzistirale tri vrste iz *P. delicatissima sensu latu* grupe.

Cvjetanje vrsta roda *Pseudo-nitzschia* može biti potaknuto hranjivim tvarima iz nekoliko izvora: uzlazne struje (engl. *upwelling*), miješanje vodenog stupca ili riječnih donosa. Oba izvora potiču cvjetanje roda *Pseudo-nitzschia* u koncentracijama od 8–22 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^-$, 2,4–35 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{SiO}_4$, 0,2–2 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$ (Loureiro i sur., 2005), ali pri različitim temperaturama i salinitetu. Visokoj abundanciji i mogućnosti sinteze DK na zapadnoj obali SAD-a pogoduju niske temperature, visoki salinitet, te visoke koncentracije hranjivih soli, što je karakteristično za uzlazne struje.

U mnogim regijama diljem svijeta donosi rijeka potiču toksična cvjetanja vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia*, a razlikuju se zbog nižeg saliniteta i viših temperatura od zona uzdizanja (Scholin i sur., 2000; Spatharis i sur., 2007).

Razlika između hranjivih soli u zonama uzdizanja i ušćima rijeka je da su riječni donosi vjerojatno rezultat antropogenog utjecaja. Sedimentološki podaci pokazuju porast abundancije *Pseudo-nitzschia* u rijeci Mississippi od 1950. što ukazuje na prilagodbu ekosistema na povećan donos hranjivih soli, te bi mogao biti odgovor na eutrofikaciju (Parsons i Dortch, 2002). Primijećena je povećana abundancija roda *Pseudo-nitzschia* i u ostalim riječnim sustavima.

Recentne su studije pokazale da je salinitet kontrolni čimbenik za rast i geografsku distribuciju roda *Pseudo-nitzschia* (Thessen i sur., 2005), ali su svakako potrebna daljnja istraživanja da bi se dokazala i potvrdila uloga saliniteta u distribuciji, fiziologiji i rastu ovih dijatomeja. U sjevernom Jadranu sniženi salinitet pogoduje cvjetanjima dijatomeja, ali najviše zato što je ta voda bogata hranjivim solima.

5.7 EKOLOŠKE I TAKSONOMSKE ZNAČAJKE VRSTA

PSEUDO-NITZSCHIA IZ JADRANA

5.7.1 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Vrsta *P. fraudulenta* određena je po prvi put za vrijeme cvjetanja u veljači 2008. zajedno s vrstom *P. pungens* u Limskom kanalu. Najviše dostignute abundancije bile su do 10^5 stanica L^{-1} . Nakon toga zabilježena je gotovo na svim postajama Po profila (RV001, SJ107, SJ101) i to od travnja do srpnja i ponovno tijekom jesensko-zimskog cvjetanja u prosincu 2008. Iako je abundancija bila relativno niska ($10^3 L^{-1}$) ipak su pronađene odvojene populacije ove vrste u sjevernom Jadranu.

Kolonije su imale linearan oblik s kratkim preklapanjem između stanica 14-17 % (Slika 4.28.), što je više od mjerenja u literaturi (Kaczmarska i sur., 2005b). Većina morfoloških mjerenja valve u skladu su s literaturom iako su neka mjerenja za vrstu *P. fraudulenta* iz Jadrana proširila morfološki raspon karakteristika do sada opisanih u literaturi. Naime, najviši broj fibula u $10 \mu m$ bio je 30 (za razliku od dosada opisanih 22-26; Stehr i sur., 2002; Kaczmarska i sur., 2005b; Churro i sur., 2009). U Sredozemnom moru ova se vrsta obično pojavljuje u rano proljeće, a abundancija rijetko prelazi 10^5 stanica po litri (Zingone i sur., 2006; Quijano-Scheggia i sur., 2008b). Iako je mjerena domoična kiselina u kulturama vrste *P. fraudulenta* nije potvrđena toksičnost kultura iz sjevernog Jadrana.

5.7.2 *PSEUDO-NITZSCHIA SUBFRAUDULENTA*

Kolonije su imale linearan oblik s kratkim preklapanjem između stanica 17-25 % (Slika 4.29.). Ovo je prvi nalaz ove vrste u sjevernom Jadranu. Vrsta je vrlo slična *P. fraudulenta* i neznatno se razlikuje u obliku stanice i lanaca, te je broj fibula i strija nešto manji. *P. subfraudulenta* pronađena je u Boki Kotorskoj 2008-2009. (Bosak i sur., 2010) i određena prema obliku valve koji je više linearan u njenom središnjem dijelu naspram srodne *P. fraudulenta*. *P. subfraudulenta* se u sjevernom Jadranu pojavila u jesensko zimskom razdoblju zajedno s drugim vrstama iz grupe *P. seriata*.

Broj strija bio je od 20 do 25 u 10 μm . Broj fibula kretao se od 15 do 25 u 10 μm . Strije su perforirane s dva do tri reda pora (4-6 u 1 μm). Aureole su perforirane s tri-četiri nepravilna otvora (Slika 4.29. g).

Usporedba morfoloških karakteristika *P. subfraudulentu* iz kultura s morfološkim mjerenjima od Bosak i suradnika (2010) dana su u Tablici 4.8. Posebno su istaknuti brojevi koji se razlikuju od literaturnih, naime najviši broj fibula u našim uzorcima bio je 25 u 10 μm . Domoična kiselina nije izmjerena u kulturama ove vrste.

5.7.3 *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS*

P. pungens se u Jadranu obično pojavljuje u zimskim mjesecima od prosinca do veljače, kada je pronađena u uzorcima iz Limskog kanala (Slika 4.30.) i sjevernog Jadrana (Slika 4.31.). Izraženu sezonalnost vrste *P. pungens* zabilježili su i Penna i sur. (2013) na zapadnoj obali Jadrana. Obično se pojavljuje s vrstom *P. fraudulenta*. Valve su linearnog do lanceolantnog oblika, a njihova morfologija bila je u skladu s opisanom literaturom (Slika 4.30.a-c). Kolonije vrste *P. pungens* imale su linearan oblik s preklapanjem koje je dosežalo gotovo do 1/3 stanice (Slika 4.30.), što je duže nego kod ostalih pronađenih vrsta. Broj strija bio je od 8 do 15 u 10 μm , a broj fibula kretao se od 10 do 17 u 10 μm što je u skladu s literaturom. Strije su perforirane s po dva reda pora. Jedna od važnih značajki ove vrste je nepostojanje središnje pore. Iako se *P. pungens* može prepoznati na svjetlosnom mikroskopu i pretpostavlja se da nije tako rijetka u Jadranu iznenađuje mali broj dostupnih podataka. Ljubešić i sur. (2012.) prvi su pronašli ovu vrstu u Jadranu i morfološki je karakterizirali. Penna i sur. (2013) uspjeli su molekularnom karakterizacijom potvrditi njeno postojanje, te ju genetički usporediti s ostalim populacijama u Sredozemlju i svijetu. Ustanovili su da jadranska *P. pungens* pripada grupi I i da se genetički značajno ne razlikuje od izolata iz Atlantskog i Tihog oceana. Jadranske populacije pripadaju kozmopolitskoj grupi koja čini homogenu globalnu populaciju *P. pungens*. Međutim, poznato je da kada se koristi više molekularnih markera, kao što su mikrosateliti, u analizama populacija grupe I, moguće je dobiti značajne geografske razlike na globalnoj razini što ukazuje na ograničen protok gena u određenim dijelovima mora i oceana (Casteleyn i sur., 2010).

Iako su uzgojene kulture ove vrste još uvijek nisam uspjela dobiti rezultate molekularnim metodama za različite molekularne markere kod ove vrste.

5.7.4 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

P. mannii pojavljivala se u lančanim stepenastim kolonijama. Na svjetlosnom mikroskopu vrlo je slična vrstama *P. calliantha* i *P. pseudodelicatissima* (Lundholm i sur., 2003). U kolovozu se pojavljivala s ovim vrstama te je cvjetanje opisano kao *Pseudo-nitzschia delicatissima sensu latu*. Pojavljivala se u ljetnom razdoblju kada je vodeni stupac stratificiran i nema dovoljno hranjivih soli za dominaciju jedne vrste. Morfološki *P. mannii* je vrlo slična vrsti *P. calliantha* (Lundholm i sur., 2003; Amato i sur., 2007; Amato i Montresor, 2008). Obje vrste imaju strije s jednim redom pora, slična je i gustoća pora unutar strija, a pore su podijeljene u nekoliko sektora. Mjerenja *P. manii* iz sjevernog Jadrana uglavnom su u skladu s izvornim opisom (Amato i Montresor, 2008), jedino je širina stanice u mojim uzorcima bila uža (1,3-1,7 μ m) i više odgovara opisu za vrstu *P. calliantha* (1,4-1,8 μ m za *P. calliantha*, 1,7-2,6 μ m za *P. mannii*; Amato i sur., 2007). U originalnom opisu *P. mannii* je nešto šira. Budući da su sva druga mjerenja odgovaraju izvornom opisu, vrsta je određena kao *P. mannii*.

Do sada ova je vrsta opisana i pronađena samo u Tirenskom moru, a rad Ljubešić i sur. (2011) prvi je pronalazak ove vrste u Jadranu, što su kasnije potvrdile molekularne metode na izoliranim kulturama ove vrste. *P. mannii* zabilježena je i uz zapadnu obalu Jadrana (Penna i sur., 2013) tijekom kolovoza i rujna 2009. te genetički okarakterizirana. Kod *P. mannii* do sada još nije dokazana toksičnost (Amato i Montresor, 2008).

5.7.5 *PSEUDO-NITZSCHIA PSEUDODELICATISSIMA*

Vrsta *P. pseudodelicatissima* pojavila se u cvjetanju grupe *P. pseudodelicatissima sensu latu* u kolovozu 2008. u Limskom kanalu. *P. mannii* i *P. calliantha* dominirale su cvjetanjem dok je *P. pseudodelicatissima* bila vrlo rijetka, određena je još u cvjetanju u kolovozu 2008. u sjevernom Jadranu.

Morfološki ovoj vrsti je vrlo slična *Pseudo-nitzschia cuspidata*. Jedina razlika je oblik valve, naime *P. pseudodelicatissima* ima linearni, a *P. cuspidata* lanceolantni oblik (Lundholm i sur., 2003). Vrsta je određena kao *P. pseudodelicatissima* budući je imala linearni oblik valve, a i gustoća strija, fibula i pora odgovaraju izvornom opisu ove vrste. Veličina i broj perforiranih sektora unutar pore variraju unutar iste i među valvama, što je pronašla Kaczmarska (2005b) u zaljevu Fundy u Kanadi. To je objašnjeno razlikom u silificiranosti valve, brzini rasta ili razlikama među populacijama. Morfološka, genetska i ekološka promjenjivost ove vrste nije u potpunosti istražena (Hallegraeff, 1994; Priisholm i sur., 2002; Stehr i sur., 2002; Lundholm i sur., 2003; Kaczmarska i sur., 2005b). Ova problematika morfološke promjenjivosti među valvama iste vrste definitivno otvara nova pitanja u istraživanjima.

Iako sam imala uspješne kulture do danas još nisam uspjela dobiti rezultate molekularnim metodama.

5.7.6 *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*

P. delicatissima pojavljivala se u lančanim stepenastim kolonijama. Vrsta *P. delicatissima* pojavila se u cvjetanju grupe *P. pseudodelicatissima sensu latu* koje je trajalo od travnja do srpnja 2009. na postaji RV001, iako abundancija nije bila visoka ($8,8 \times 10^3$ stanica L^{-1}) izolirane su kulture za dva različita genotipa ove vrste. Iste genotipove ponovno su izolirani u prosincu 2011. na postajama RV001 i SJ101.

P. delicatissima nije pokazala sezonalnost nego je bila prisutna u proljeće, ljeti te ponovo u zimskim mjesecima što nije u skladu s rezultatima Penne i sur. (2013). Naime, oni tvrde da *P. delicatissima* na zapadnoj obali sjevernog Jadrana ima izraženu sezonalnost i javlja se isključivo u razdoblju kasne zime i proljeća.

Dužina stanica bila je od 55,7 do 110,1 μm , a širina valve od 0,8 do 1,73 μm (Slika 4.34. a-c). U svim stanicama bila je prisutna i velika središnja pora, širine 5-6 strija. Broj strija bio je od 40 do 48 u 10 μm . Broj fibula bio je od 20 do 40 u 10 μm . Usporedba morfoloških karakteristika vrste *P. delicatissima* iz sjevernog Jadrana uspoređena s literaturnim mjerenjima prikazana je u Tablici 4.11., naime najviši broj strija u 10 μm bio je 48 od do sada izmjerenih 44 (Cusack i sur., 2004), a broj pora

kretao se od 7 do 13 u 1 μm (Tablica 4.11.) što pomiče raspon mjerenja do sada opisanih u literaturi (Kaczmarska i sur., 2005b).

Caroppo i sur. (2005) po prvi put su zabilježili vrstu *P. delicatissima* u južnom Jadranu zajedno s vrstom *P. calliantha*. Za razliku od sjevernog Jadrana gdje je udio roda *Pseudo-nitzschia* u ukupnim dijatomejama prilično visok do 70-91 % (Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011), u južnom Jadranu udio u ukupnim dijatomejama *P. delicatissima* bio je 7 %, a *P. calliantha* 3 %.

Mnoge kulture potencijalno toksične vrste *P. delicatissima* izolirane u sjevernom Jadranu podvrgnute su mjerenjima domoične kiseline. Unatoč tome DK nije detektirana. Penna i sur. (2013) izmjerili su niske koncentracije DK (na razini limita detekcije 0,040-0,006 fg stanici⁻¹) u 7 kultura vrste *P. delicatissima* izoliranih na zapadnoj obali sjevernog Jadrana. Samo je jedna kultura imala koncentraciju DK od 0,063 fg stanici⁻¹ što se moglo kvantificirati. Vjerojatno i među našim kulturama postoje potencijalno toksične, te bi trebalo nastaviti s mjerenjima DK u kulturama koje su ograničene hranjivim solima preciznijom metodologijom.

5.7.7 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Istraživanja o distribuciji i ekologiji vrste *P. calliantha* pobudila su značajan interes znanstvenika, budući je to kozmopolitska vrsta koja ima mogućnost lučenja DK (Lundholm i sur., 1997; Lundholm i sur., 2003). U Jadranskom moru *P. calliantha* otkrivena je prvi put 2003. u uzorcima iz Tršćanskog i Kaštelanskog zaljeva (Lundholm i sur., 2003). *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundhum, Hasle & Moestrup, opisana je nakon revizije dvije morfološki slične vrste: *P. pseudodelicatissima* i *P. cuspidata* (Hasle) emend. Lundholm, Hasle et Moestrup. Revizija se temeljila na dimenzijama valve, finoj strukturi pora, morfologiji i rezultatima molekularnih analiza (Lundholm i sur., 2003). Kasnije je pronađena u južnom Jadranu uz talijansku obalu te u estuariju rijeke Zrmanje (Caroppo i sur., 2005; Burić i sur., 2008).

Detaljnou analizom očišćenih frustula utvrđeno je da je potencijalno toksična vrsta *P. calliantha* dominirala u cvjetanju koje je trajalo od kolovoza do listopada, duž istočne obale sjevernog Jadrana 2007. godine (Marić i sur., 2011). Mjerenja na uzorcima iz sjevernog Jadrana proširila su morfološki raspon karakteristika ove vrste

koja je do sada opisana u literaturi (Lundholm i sur., 2003; Caroppo i sur., 2005; Amato i sur., 2007; Spatharis i sur., 2007). Naime, minimalna širina stanice u našim uzorcima bila je 0,7 μm (za razliku od dosada opisanih 1,3 μm), najveći broj fibula u 10 μm bio je 27 (za razliku od dosada opisanih 25), a strija 45 u 10 μm (za razliku od do sada opisanih 40). Za vrijeme cvjetanja nisu zamijećene razlike u morfologiji frustule među postajama u sjevernom Jadranu.

Tijekom cvjetanja *P. calliantha* činila je 70 % ukupne fitoplanktonske zajednice. Najviše dostignute abundancije bile su do 10^6 stanica L^{-1} .

Iz literature je poznato da *P. calliantha* ima mogućnost sinteze DK u različitim područjima širom svijeta, kao i u kulturama (Martin i sur., 1990; Lundholm i sur., 1997; Lundholm i sur., 2003; Besiktepe i sur., 2008). DK u Jadranskom moru zabilježena je 2000. godine prvi put uz talijansku obalu u tkivu školjkaša (*M. galloprovincialis*) s koncentracijom $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ uz obalu Emilie-Romagne (Ciminiello i sur., 2005). Uzorci su analizirani masenim spektrofotometrom. Njihovi su rezultati potvrdili da je ovaj snažan neurotoksin prisutan i u Jadranskom moru. Iako su koncentracije DK u analiziranim uzorcima bile daleko ispod zakonski propisane granice, isti su autori preporučili pažljivo praćenje ovog snažnog toksina u mesu školjkaša. Čini se da se od tada DK pojavila u nekoliko navrata primjerice, u siječnju 2006. u estuariju rijeke Krke (Ujević i sur., 2010) gdje je izmjerena koncentracija dosegala $6,55 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tijekom promatranog cvjetanja vrste *P. calliantha* 2007. godine u sjevernom Jadranu, izmjerene su niske koncentracije DK u prirodnim populacijama školjkaša vrsta *Flexopecten proteus* i *Pecten jacobaeus* ($1,32 \mu\text{g g}^{-1}$, Marić i sur., 2011). Ovako niske koncentracije DK mogu se objasniti time da je najviša abundancija vrste *P. calliantha* (10^6 stanica L^{-1}) bila u vodenom stupcu na oko 10 metara dubine dok su školjkaši uzorkovani s dna (Slike 4.36 i 4.37). Ova zapažanja pokazuju da je cvjetanje vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu prethodilo mjerenjima DK u tkivima školjkaša (Marić i sur., 2011).

Mnoge kulture potencijalno toksične vrste *P. calliantha* izolirane u sjevernom Jadranu podvrgnute su mjerenjima domoične kiseline. Unatoč tome DK nije detektirana. Penna i sur. (2013) su također mjerili DK u kulturama izoliranim na zapadnoj obali sjevernog Jadrana i njihova su mjerenja bila negativna.

Iz literature je poznato da većina vrsta koje imaju mogućnost proizvodnje DK iz roda *Pseudo-nitzschia* su priobalne, a količina DK po stanici kreće se od < 1 do 100 pg (iako obično < 100 pg stanici⁻¹), ovisno o vrsti, veličini stanica i uvjetima u kojima rastu (Trainer i sur., 2012).

P. australis (dužina stanice 73-129 μm , širina 6,0-7,8 μm) je vrsta za koju je u laboratorijskim kulturama zabilježena najviša koncentracija DK po stanici (78 pg; Trainer i sur., 2000), a najniža koncentracija izmjerena je kod *P. galaxiae* (dužine 10-82 μm , 1,0-1,8 μm širine), kada je toksična, sadrži samo 0,36 fg DK po stanici (Cerino i sur., 2005).

Besiktepe i suradnici (2008) pronašli su toksične sojeve vrste *P. calliantha* u fitoplanktonskoj zajednici Crnog mora. Koncentracija DK izlučene po stanici kretala se do 1,3 pg. Iz eksperimenata s kulturama ustanovili su da se najviša koncentracije DK izmjerena u ranoj eksponencijalnoj fazi ili nakon stacionarne faze rasta. Thessen i sur. (2009) uspoređivali toksične sojeve i proizvodnju DK kod više vrsta *Pseudo-nitzschia* (*P. multiseriata*, *P. fraudulenta* i *P. calliantha*). Iz njihovih je rezultata i usporedbe među vrstama *P. calliantha* ispala najslabiji proizvođač DK. DK je mjerena kada su kulture bile u stacionarnoj fazi, nakon diobe stanica i nakon limitacije fosforom, dušikom ili svjetlom. U vrijeme kada je izmjerena DK u Jadranu cvjetanje *P. calliantha* je vjerojatno doseglo stacionarnu fazu rasta s ograničenom koncentracijom ortosilicija i fosfora kao što pokazuju značajne statističke korelacije (Spearman, npr. negativna korelacija s ortosilicijem), te je za pretpostaviti da bi to moglo objasniti tako nisku DK izmjerenu u sjevernom Jadranu (Marić i sur., 2011).

P. calliantha ima široku geografsku rasprostranjenost i pretpostavlja se da je kozmopolitska vrsta (Lundholm i sur., 2003).

U različitim znanstvenim radovima razlikuju se i statističke korelacije između *Pseudo-nitzschie* i ostalih okolišnih varijabli. Npr. *P. calliantha* u sjevernom Jadranu pozitivno korelira s temperaturom što je bio slučaj i u zapadnom Sredozemlju tako je viša abundancija zabilježena u toplijem djelu godine npr. u kasno ljeto i jesen (Quijano-Scheggia i sur., 2008b; Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011). Budući se od rada do rada nalaze različite korelacije čini se da abiotički čimbenici sami po sebi nisu dovoljni kako bi predvidjeli ekološke okolnosti koje dovode do masovnih cvjetanja vrsta roda *Pseudo-nitzschia*.

Marchetti i sur. (2004) mjerili su utjecaj hranjivih tvari na abundanciju vrsta roda *Pseudo-nitzschia* i proizvodnju DK, te akumulaciju u prirodi, u oceanskom vrtlogu Juan de Fuca, vrlo specifičnom prirodnom okolišu. Oni su predložili tri okolnosti koje bi mogle dovesti do povišene koncentracije DK u prirodi: *i*) nizak omjer Si:N omogućio bi stanicama *Pseudo-nitzschia* preživljavanje nad ostalim dijatomejama budući koriste niske koncentracije ortosilicija, *ii*) s druge strane koncentracije dušika trebale bi biti dovoljno visoke kako bi se osiguralo da *Pseudo-nitzschia* ne bude ograničena dušikom što omogućuje proizvodnju DK, *iii*) treći uvjet je vrijeme zadržavanja stanica *Pseudo-nitzschia* u vrtlogu koje treba biti dovoljno dugo da se DK proizvede i nakupi (Marchetti i sur., 2004).

5.8 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE 18S

Sve provedene analize (analiza sličnosti najbližih susjeda, engl. *Neighbour-Joining similarity representation*-NJ) kao i većina filogenetskih rekonstrukcija (*parsimoneous phylogenetic reconstruction*) za hipervarijabilno područje 18S rDNA dala je jako i stabilno grupiranje svih poznatih vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia*. Nadalje, za vrste *P. delicatissima* i *P. fraudulenta* pronađeno je više tipova regije 18S rDNA koje predstavljaju vjerojatno odvojene populacije. Prvi tip za vrstu *P. delicatissima* zabilježen je od travnja do srpnja 2009. godine na postaji RV001 i u prosincu 2011. na postaji SJ101. To ukazuje na postojanu i stalnu populaciju unutar sjevernog Jadrana. U isto vrijeme s prvim tipom pronašli smo i drugi tip u lipnju 2009. na postaji RV001. A treći i četvrti tip pronađeni su zajedno s prvim tipom na postaji SJ101 u prosincu 2011. i na postaji RV001 u travnju 2009. To ukazuje na najmanje četiri genetski (ali ne i prostorno ili vremenski) odvojene populacije vrste *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu.

Između različitih tipova nisu zapažene značajne morfološke razlike. Postoji mogućnost da ista vrsta ima nekoliko replika gena za 18S, iako polimorfizam u ovoj regiji za sada nije dokazan kod dijatomeja. Postoji mogućnost da se radi o kriptičkim i pseudokriptičkim vrstama.

Lundholm i sur. (2003; 2006) i zatim Amato i sur. (2007) dokazali su da se kriptične i pseudo-kriptične vrste pronalaze mnogo češće nego što se ranije očekivalo. Kriptične vrste su morfološki identične, ali genetski različite, dok su pseudo-kriptične vrste, osim genetske raznolikosti, pokazale neznatne morfološke razlike koje su otkrivene detaljnim usporedbama (Mann i Evans, 2007). Postojanje kriptičnih i pseudo-kriptičnih vrsta dodatno otežava određivanje vrsta ovog roda.

Za vrstu *P. fraudulenta*, u sjevernom Jadranu pronađena su dva različita tipa 18S rDNA. Prvi je tip zabilježen na postaji RV001 u svibnju 2009. i na postaji SJ108 u travnju 2009., na postaji LIM3 u prosincu 2010., kao i u Atlantskom oceanu u državi Maine (SAD). To pokazuje stalnu i dobro rasprostranjenost populacija vrste *P. fraudulenta* prvog tipa u sjevernom Jadranu. Drugi tip regije 18S rDNA zabilježen je na postaji SJ101 u prosincu 2011. koja može ukazivati na drugu genetski (ali ne prostorno ili vremenski) odvojenu populaciju vrste *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu. Usporedbom detaljnih morfoloških obilježja uočene su neznatne morfološke razlike i moguće je da neke populacije pripadaju srodnoj vrsti *P. subfraudulenta* koja se u filogenetskim analizama grupira zajedno s vrstom *P. fraudulenta*.

5.9 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE ITS1-5,8S-ITS

5.9.1 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

Na osnovi poznatih sekvenci za regiju ITS1-5,8S-ITS2 pronađena je intraspecifična promjenjivost do 0,6 %, a bliska vrsta *P. fraudulenta* dostiže promjenjivost od 26,5% u usporedbi sa sekvencama za *P. mannii*.

Sekvence za vrstu *P. mannii* regije ITS1-5,8S-ITS2 čine blisku grupu u analizama sličnosti i filogenetskim analizama i time omogućuju sigurno određivanje ove vrste. Sekvence izolirane iz srednjeg Jadrana najbližije su sekvencama izoliranim iz Grčke (Benson i sur., 2011). Druga grupa izoliranih sekvenci također potječe iz grčkih voda, a slijedi ju grupa sekvenci izoliranih u Napuljskom zaljevu (Amato i Montresor, 2008).

5.9.2 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Sekvence za regiju ITS1-5,8S-ITS2 donose značajnu razliku između sojeva vrste *P. fraudulenta*. Pronađena je intraspecifičnu promjenjivost sekvenci do 1,9 % među izolatima *P. fraudulenta* iz različitih mora. Razlika između sekvenci vrste *P. fraudulenta* i bliske vrste *P. delicatissima* dostigla je promjenjivost od 22,1 %. Sve sekvence za vrstu *P. fraudulenta* za ovu regiju u analizama sličnosti i filogenetskim analizama čine blisku grupu i time omogućuju sigurno određivanje ove vrste.

Sekvence izolirane iz uzoraka u sjevernom Jadranu tvore zatvorenu grupu i vrlo su slične sekvencama izoliranim iz uzoraka u Atlantskom oceanu (SAD, Francuska i Portugal, Quijano-Scheggia i sur., 2008b; Churro i sur., 2009; Thessen i sur., 2009), kao i sekvencama s katalonske obale, tj. Španjolske (Andree i sur., 2011). Međutim, pronađena su dva različita tipa regije ITS-a u sjevernom Jadranu što ukazuje na suživot dvije populacije vrste *P. fraudulenta*.

Tri kulture vrste *P. fraudulenta* s identičnim sekvencama za regiju ITS1-5.8S-ITS2 izolirane su na postaji SJ108 u travnju, na postaji RV001 u svibnju 2009. i na postaji LIM3 u lipnju 2010. To ukazuje da se populacija proširila od zapadne prema istočnoj obali sjevernog Jadrana u kasno proljeće 2009. godine što je omogućeno zatvorenom cirkulacijom u sjevernom Jadranu. Godinu dana kasnije, početkom ljeta ponovno je izoliran identičan tip ITS1-5.8S-ITS2 na postaji LIM3. To dokazuje da ovaj tip ITS1-5.8S-ITS2 ili populacija perzistira unutar sjevernog Jadrana na različitim postajama i sezonama kroz godine.

Međutim godinu dana kasnije u travnju 2011. izoliran je i drugi tip ITS1-5.8S-ITS2 na postaji SJ101, gdje se razvijaju intenzivna proljetna cvjetanja dijatomeja i *Pseudo-nitzschia* u vodi bogatoj hranjivim solima iz rijeke Po. To ukazuje na postojanje ili koegzistenciju druge, genetski odvojene populacije, vrste *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu.

S obzirom na strujanje u sjevernom Jadranu i stalnu prisutnosti stanica iz roda *Pseudo-nitzschia* u fitoplanktonu sjevernog Jadrana *P. fraudulenta* najvjerojatnije perzistira s vrlo niskom abundancijom za vrijeme nepovoljnih uvjeta, primjerice razvija povišene abundancije čim uvjeti postanu povoljniji za njen rast (rano proljeće, jesen).

Ljeti abundanciju vrste *P. fraudulenta* vjerojatno kontroliraju resursi i kompeticija s ostalim vrstama.

5.9.3 *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*

Na temelju uspoređivanja sekvenci za regiju ITS1-5,8S-ITS2 ustanovljeno je da postoji značajna razlika između sojeva vrste *P. delicatissima*. Pronađena je intraspecifična promjenjivost sekvenci do 0,8 % među izolatima vrste *P. delicatissima* iz različitih mora, dok razlika između sekvenci vrste *P. delicatissima* i srodne vrste *P. micropora* dostiže promjenjivost od 5,5 %. Sve sekvence za vrstu *P. delicatissima* za ovu regiju čine blisku grupu u analizama sličnosti i filogenetskim analizama i time omogućuju sigurnu identifikaciju ove vrste.

Sekvence izolirane iz uzoraka iz sjevernog Jadrana tvore usku grupu i prilično se razlikuju od sekvenci izoliranih iz uzoraka iz Atlantskog oceana (Fehling i sur., 2006), Japana i Australije (Lundholm i sur., 2003; Lundholm i sur., 2006). Međutim, pronađena su dva različita tipa regije ITS-a u sjevernom Jadranu što ukazuje na suživot dvije populacije vrste *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu. Moguće je da različiti tipovi regije ITS-a pripadaju i različitim vrstama koje još nisu do kraja razjašnjene unutar grupe *P. delicatissima*.

Pseudo-nitzschia delicatissima je podijeljena na pseudo-kriptične vrste: *P. delicatissima*, *P. decipiens* i *P. dolorosa*. Međutim, nedavno je otkriveno da se vrsta *P. delicatissima*, u filogenetskim analizama zapravo sastoji od dvije odvojene grane, koje čine dvije kriptične vrste *P. delicatissima* i *P. arenysensis* (Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2006; Quijano-Scheggia i sur., 2009).

P. delicatissima i *P. arenysensis* su morfološki identične, a razlikuju se jedino u sekundarnoj strukturi regije ITS2. i ponašanju pri spolnom razmnožavanju.

5.9.4 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Na osnovi sekvenci regije ITS1-5,8S-ITS2 zabilježena je značajna razlika između sojeva vrste *P. calliantha*. Potvrđena je intraspecifičnu promjenjivost sekvenci do 4,3 %

među izolatima vrste *P. calliantha* iz različitih mora, dok je razlika između sekvenci za vrstu *P. calliantha* i blisku vrstu *P. fraudulenta* dostiže promjenjivost od 36 %. Sve sekvence za vrstu *P. calliantha* za ovu regiju čine blisku grupu u analizama sličnosti i filogenetskim analizama i time omogućuju sigurnu identifikaciju ove vrste. Set podataka sadrži 26 različitih tipova ITS-a izoliranih diljem svijeta. Sekvence izolirane iz sjevernog Jadrana razlikuju se od do sada poznatih tipova regije ITS što ukazuje na postojanje odvojene i postojeće (autohtone) populacije vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu.

Kultura *P. calliantha* izolirana je s postaje RV001 u srpnju 2011. Iako Istočna Jadranska Struja (EAC) donosi vodu iz južnog Jadrana i Sredozemlja na ovu postaju malo je vjerojatno da je struja uspjela spojiti populacije iz katalonskih voda s populacijom u sjevernom Jadranu (Quijano-Scheggia i sur., 2010) koje su u SAP-u evolucijski povezane. U ljetnim mjesecima cirkulacija u sjevernom Jadranu većinom je zatvorena i vjerojatnije je da je populacija *P. calliantha* odvojena i autohtona za sjeverni Jadran.

5.10 MOLEKULARNE ZNAČAJKE REGIJE 28S

Filogenetska analiza temeljena na regijama D1-D3 velike ribosomske podjedinice 28S rDNA rezultirala je u potpunosti riješenom filogenijom. Jedino pozicioniranje vrste *P. delicatissima* u stablu je podržano s vrijednostima manjim od 100 %. To znači, da bi grupa *P. delicatissima* mogla biti blisko povezana s ostalim grupama, tj. vrstama u stablu, uključujući *P. pungens*, *P. multiseriis*, *P. brasiliiana*, *P. americana*, *P. australis*, *P. multistriata*, *P. fraudulenta*, *P. pseudodelicatissima* i *P. cf. subpacific*a ili s vrstama *P. dolorosa* i *P. micropora*. Međutim, ova nejasnoća može biti rezultat nedovoljnog broja sekvenci i uzoraka za grupe vrsta *P. dolorosa* i *P. micropora*. Odlična statistička podrška (visoke bootstrap vrijednosti, Slika 4.45.) za ovu filogenetsku analizu znači, da analizirane regije D1-D3 28SrDNA donose dovoljno filogenetskih informacija za analiziranje i uspoređivanje vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia*.

Postojanje intraspecifične promjenjivosti u analiziranim regijama D1-D3 velike ribosomske podjedinice 28S rDNA je vrlo iznenađujuće i neočekivano. Smatralo se da je ova regija prilično očuvan filogenetski marker. Međutim, pronađene razlike

sugeriraju postojanje odvojenih populacija. Daljnja istraživanja potrebna su da bi se dokazalo da li se ovim analizama može razlučiti i postojanje kriptičnih vrsta. Rezultati naših morfoloških mjerenja za sada ne podržavaju pronalazak novih vrsta. Jedno od značajnijih otkrića ovog istraživanja je intraspecifična promjenjivost u regijama 18S i 28S, što je podržano istom u regiji 1TS1-5,8S-ITS2 potvrđuje ideju o genetski odvojenim, simpatričnim (engl. *sympatric*), sinspecifičnim (engl. *synspecific*) populacijama vrsta *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu.

5.11 ANALIZA POPULACIJA MOLEKULARNIM MARKERIMA

5.11.1 *PSEUDO-NITZSCHIA MANNII*

Statistička analiza parsimonije (SAP, engl. *statistical parsimony analysis*; Slika 4.41.) ukazuje na vjerojatnu evolucijsku vezu između sojeva vrste *P. mannii* izoliranih u Napuljskom zaljevu (Amato i Montresor, 2008) i u grčkim vodama (Benson i sur., 2011). Druga evolucijska veza dokazana je između dva tipa regije ITS iz grčkih voda i tipa regije ITS pronađenog u srednjem Jadranu. Jedan od mogućih scenarija koji se uklapa u objašnjavanje evolucijskih veza između različitih sojeva ove vrste je spora invazija vrste *P. mannii* iz zapadnog Sredozemlja preko Tirenskog mora u Jadran s osnivanjem lokalno ustaljenih subpopulacija u Napuljskom zaljevu, Tirenskom moru i srednjem Jadranu. Međutim, bez određivanja starosti spomenutih populacija, ne možemo isključiti i mogućnost naseljavanja u suprotnom smjeru. Nadalje, vjerojatno još postoje brojni neotkriveni tipovi regije ITS u Sredozemnom moru koji bi pomogli da se rasvijetli evolucijsko naseljavanje ove vrste. Učestalijim uzorkovanjem u Sredozemlju vjerojatno bi se otkrili još mnogi novi tipovi regije ITS, s njima i mogući evolucijski scenariji.

Potrebno je napomenuti, da je pronađeni tip regije ITS za vrstu *P. mannii* iz srednjeg Jadrana, značajno različit od do sada poznatih tipova regija ITS iz drugih područja. To je snažna indikacija za postojanje odvojene i autohtone populacije vrste *P. mannii* u srednjem Jadranu.

5.11.2 *PSEUDO-NITZSCHIA FRAUDULENTA*

Statistička analiza parsimonije (SAP, engl. *statistical parsimony analysis*, Slika 4.48.) za vrstu *P. fraudulenta* ukazuje na vjerojatnu evolucijsku povezanost između tipova regije ITS izoliranih iz sjevernog Jadrana (na slici treći tip), tipova regije ITS izoliranih iz Atlantskog oceana (Quijano-Scheggia i sur., 2008b; Churro i sur., 2009; Thessen i sur., 2009) i dva tipa regije ITS izoliranih iz španjolskih voda (Andree i sur., 2011). Drugi tip regije ITS (na slici 5. tip) pronađen u sjevernom Jadranu evolucijski je povezan s tipovima regije ITS izoliranim u Španjolskoj i u Atlantskom oceanu. Peti tip regije ITS iz sjevernog Jadrana može biti povezan s ostala četiri tipa, ali nedostaje još jedan međutip da bi vjerojatnost dostigla 95 %. Šesti tip regije ITS pronađen je u Škotskoj (Lundholm i sur., 2003), i u SAP se pojavljuje kao zasebna grupa, te ni na koji način nije povezan s ostalih 5. Ova vrlo složena mreža tipova omogućuje objašnjavanje evolucije preko nekoliko mogućih scenarija disperzije i odvajanja populacija vrste *P. fraudulenta*. Postojanje dva različita tipa regije ITS, evolucijski vrlo udaljena u sjevernom Jadranu, ukazuje na dvije moguće invazije. Tip pronađen u srednjem Jadranu direktno je evolucijski povezan s tipom pronađenim u sjevernom Jadranu. Peti tip iz sjevernog Jadrana preko karike koja nedostaje indirektno je povezan s dva tipa iz Španjolske, s tipom iz sjevernog Jadrana i tipom iz Atlantskog oceana (Slika 4.48.). Za vrstu *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu pronađena su dva različita tipa regije ITS, koja se značajno razlikuju od do sada zabilježenih. To je podrška postojanju dvije odvojene i autohtone populacije vrste *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu. Postoji mogućnost da jedan od tipova pripada i vrsti *P. subfraudulenta* koja je morfološki vrlo slična vrsti *P. fraudulenta*.

5.11.3 *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*

Statistička analiza parsimonije (SAP, engl. *statistical parsimony analysis*, Slika 4.49.) za vrstu *P. delicatissima* pokazuje vjerojatnu evolucijsku povezanost različitih tipova regije ITS izoliranih iz Atlantskog oceana i Škotske (Fehling i sur., 2006). U škotskim vodama izolirana su tri različita tipa regije ITS koja nisu izravno evolucijski povezana.

Jedan tip pronađen je u izolatima iz Kanade, Francuske i Škotske (Fehling i sur., 2006; Lundholm i sur., 2006), tj. u vodama Atlantskog oceana. Jedan prilično udaljen tip regije ITS pronađen je u izolatima iz Mainea (SAD).

Evolucijski najudaljeniji tip regije ITS pronađen u izolatima iz Australije (Lundholm i sur., 2003) i nije evolucijski povezan s ostalim tipovima regije ITS korištenim u analizi, te tvori svoju odvojenu grupu (Slika 4.49.). Za vrstu *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu pronađena su dva različita tipa ITS-a, koja se značajno razlikuju od do sada pronađenih. To je podrška postojanju dvije odvojene autohtone populacije vrste *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu.

Za vrstu *P. delicatissima* četiri je puta izoliran identičan tip regije ITS u travnju, lipnju i srpnju 2009. s postaje RV001, te ponovno u studenom 2011. s postaje SJ101. To dokazuje da je taj tip regije ITS perzistentan u sjevernom Jadranu, tj. da se populacija širi i stalno je prisutna u sjevernom Jadranu u različitim sezonama i godinama. Međutim, u lipnju 2009. izoliran je drugi tip regije ITS za vrstu *P. delicatissima* na postaji RV001. Ovo ukazuje na postojanje i koegzistenciju dvije, genetski odvojene populacije vrste *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu.

Međutim, nedavno je otkriveno da se vrsta *P. delicatissima*, u filogenetskim analizama zapravo sastoji od dvije odvojene grane, koje čine dvije kriptične vrste *P. delicatissima* i *P. arenysensis* (Orsini i sur., 2004; Lundholm i sur., 2006; Quijano-Scheggia i sur., 2009). Ove dvije vrste su morfološki potpuno iste, ali usporedba sekundarne strukture regije ITS2 podupire tezu da su to odvojene vrste. Budući je *P. arenysensis* morfološki identična vrsti *P. delicatissima* moguće je da je drugi tip regije ITS1-5.8S-ITS2 izoliran u lipnju 2009. na postaji RV001 zapravo vrsta *P. arenysensis*.

S obzirom na strujanje u sjevernom Jadranu i stalnu prisutnost stanica iz roda *Pseudo-nitzschia* u fitoplanktonu sjevernog Jadrana *P. delicatissima* najvjerojatnije perzistira s vrlo niskom abundancijom za vrijeme nepovoljnih uvjeta primjerice zimi i razvija povišene abundancije čim uvjeti postanu povoljniji za njen rast (proljeće, početak ljeta). Ljeti abundanciju vrste *P. delicatissima* vjerojatno kontroliraju resursi i kompeticija s ostalim vrstama.

5.11.4 *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*

Statistička analiza parsimonije (engl. *statistical parsimony analysis* - SAP, Slika 4.50.) za vrstu *P. calliantha* vjerojatno pokazuje izravnu evolucijsku vezu između različitih tipova regije ITS pronađenih u izolatima iz Atlantskog oceana (SAD, Tirensko more i Katalonsko more; Thessen, 2007; Thessen i sur., 2009; Andree i sur., 2011) i izolatima iz Španjolske (delta rijeke Ebro). Evolucijski udaljen, drugačiji tip regije ITS (tip 8., Slika 4.50.) pronađen je u državi Karolini, obala SAD-a (Thessen, 2007; Thessen i sur., 2009). Tipovi regije ITS od 2. do 5., te 7. i 10. (Slika 4.50.) pronađeni su u izolatima iz različitih regija Španjolske (Quijano-Scheggia i sur., 2010). Iako svi dolaze iz Španjolske većina njih nije direktno evolucijski povezana, osim 3. i 4. tipa i 4. i 9. tipa. Čini se da su se iz četvrtog tipa regije ITS evolucijski razvila još dva tipa. Šesti tip pronađen je u izolatima iz sjevernog Jadrana i neizravno je evolucijski povezan s prvim tipom iz Atlantskog oceana, jer nedostaje još jedna karika u lancu da bi bili povezani s vjerojatnošću od 95 %.

Mogući scenarij za objašnjavanje izravne veze s jednim hipotetskim posrednikom između prvog tipa pronađenog u Atlantiku i šestog tipa pronađenog u sjevernom Jadranu mogao bi biti izravna invazija Atlantske ili populacije iz zapadnog Sredozemlja u sjeverni Jadran putem balastnih voda. Važno je napomenuti, da smo pronašli jedinstven tip regije ITS za vrstu *P. calliantha* u sjevernom Jadranu koji je jasno odvojen od dosad poznatih tipova regije ITS iz drugih područja. To je snažna indikacija za postojanje odvojene i autohtone populacije vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu.

6.ZAKLJUČCI

6 ZAKLJUČCI

Sjeverni Jadran kao relativno mali i plitak bazen daje snažne i brze odgovore na antropogene i prirodne promjene u ekosustavu. Tijekom posljednjeg desetljeća dogodile su se značajne promjene u nekim okolišnim parametrima. Vrijednosti saliniteta porasle su poslije 2000. godine. Povišene vrijednosti saliniteta povezane su sa smanjenim protokom rijeke Po u kombinaciji s promjenom u cirkulaciji cijelog sjevernog Jadrana. Ovo je rezultiralo nižom koncentracijom hranjivih soli i nižom primarnom proizvodnjom.

Analizama fitoplanktonske zajednice ustanovljeno je da se abundancija fitoplanktona značajno smanjila nakon 2000-te godine što ukazuje na klimatske i antropogene utjecaje na fitoplankton sjevernog Jadrana.

Također je došlo do promjena u sezonalnosti, sastavu vrsta i razdobljima cvjetanja fitoplanktona. Na postaji RV001 rano proljetno cvjetanje je gotovo izostalo, a najviše godišnje vrijednosti abundancije pomaknule su se s proljetnog na jesensko razdoblje.

Pomak sustavna (*Regime shift*) koji je otkriven u abundanciji fitoplanktona i okolišnim parametrima nije utjecao na smanjenje bioraznolikosti fitoplanktona.

Vrste roda *Pseudo-nitzschia* su među najbrojnijim i najzastupljenijim dijatomejama u sjevernom Jadranu, a posljednjih godina opažena je promjena u sastavu vrsta unutar roda. Rod *Pseudo-nitzschia* specifičan je i po tome što neke vrste imaju mogućnost sinteze domoične kiseline (DK), snažnog neurotoksina.

Opazena je promjena unutar roda *Pseudo-nitzschia*. Početkom 70-tih godina prošlog stoljeća fitoplanktonskom zajednicom sjevernog Jadrana dominirale su vrste iz grupe *P. seriata*. U 1970-tim učestalost pojavljivanja kretala se od 36-89 %, otada taj je udio postupno opadao tako da u posljednje vrijeme učestalost pojavljivanja nije veća od 12,5 %.

Pseudo-nitzschia delicatissima prvi se put pojavila u 1978. godine i otad joj učestalost pojavljivanja raste. Na primjer, grupa *P. delicatissima* u razdoblju od 1993-2010. ima učestalost pojavljivanja od 76-97 %.

Iako je poznato da rod *Pseudo-nitzschia* dominira među ostalim planktonskim dijatomejama sjevernog Jadrana, stvarni sastav vrsta i njihova sukcesija, zbog ograničenja svjetlosne mikroskopije, djelomice su rasvijetljene ovim doktoratom ali daljnja su istraživanja neophodna.

U radu su određene ekološke, taksonomske i molekularne značajke ovoga roda u sjevernom Jadranu.

Za sada je pronađeno i potvrđeno elektronskim mikroskopom i molekularnim metodama postojanje sedam vrsta *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu. Određene su tri vrste iz *P. seriata* grupe i to su *P. fraudulenta*, *P. pungens* i *P. subfraudulenta*. Kao i četiri vrste iz grupe *P. delicatissima* i to *P. manii*, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* i *P. calliantha*.

Ekološki i taksonomski okarakterizirane su vrste koje se pojavljuju u Lirskom kanalu, gdje je određeno pet vrsta iz roda *Pseudo-nitzschia*, te je praćeno cvjetanje vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu.

Otkriveno je postojanje intraspecifične promjenjivosti u analiziranim regijama D1-D3 velike ribosomske podjedinice 28S rDNA što je vrlo iznenađujuće i neočekivano. Smatralo se da je ova regija prilično očuvan filogenetski marker. Međutim, pronađene razlike ukazuju na postojanje odvojenih populacija unutar sjevernog Jadrana. Daljnja istraživanja su nužna da bi dokazali da li se ovim analizama može razlučiti i postojanje kriptičnih vrsta. Rezultati mojih morfoloških mjerenja za sada ne podržavaju pronalazak novih vrsta. Jedno od značajnijih otkrića ovog istraživanja je intraspecifična promjenjivost u regijama 18S i 28S, što je podržano s promjenjivošću u regiji ITS1-5,8S-ITS2, čime se potvrđuje pretpostavka o genetski odvojenim, simpatričnim i sinspecifičnim populacijama vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu.

Sekvence vrste *P. manii* iz srednjeg Jadrana, značajno se razlikuju od do sad poznatih tipova regije ITS iz drugih područja. To je snažna indikacija za postojanje odvojene i autohtone populacije vrste *P. manii* u srednjem Jadranu.

Za vrstu *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu pronađena su dva različita tipa regije ITS koja se značajno razlikuju od do sada zabilježenih tipova. To je jasan pokazatelj postojanja dvije odvojene autohtone populacije vrste *P. fraudulenta* u sjevernom Jadranu ili prisutnost srodne vrste *P. subfraudulenta* koja se u većini filogenetskih analiza grupira zajedno s vrstom *P. fraudulenta*.

Za vrstu *P. delicatissima* u sjevernom Jadranu pronađena su dva različita tipa regije ITS koja se značajno razlikuju od do sada pronađenih tipova. To je jasan pokazatelj postojanja dvije odvojene autohtone populacije vrste *P. delicatissima* u sjevernom

Jadranu ili eventualno postojanje vrsta i populacija *P. delicatissima* i *P. arenysensis* koje su morfološki identične, a razlikuju se jedino u sekundarnoj strukturi regije ITS2.

Za vrstu *P. calliantha* pronađen je jedinstven tip regije ITS u sjevernom Jadranu koji je jasno odvojen od dosad poznatih tipova regije ITS iz drugih područja. To je jasan pokazatelj postojanja odvojene i autohtone populacije vrste *P. calliantha* u sjevernom Jadranu.

Budući su isti tipovi regije ITS pronađeni u različito doba godine, na različitim postajama nekoliko godina za redom to je pokazatelj postojanja odvojenih i perzistentnih populacija *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu.

7. POPIS LITERATURE

7 POPIS LITERATURE

- Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Levialdi Ghiron, J.H., Mann, D.G., Pröschold, T., Montresor, M., 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158, 193-207.
- Amato, A., Montresor, M., 2008. Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudonitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia* 47, 487-497.
- Andree, K.B., Fernández-Tejedor, M., Elandaloussi, L.M., Quijano-Scheggia, S., Sampedro, N., Garcés, E., Camp, J., Diogène, J., 2011. Quantitative PCR coupled with melt curve analysis for detection of selected *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) from the northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1651-1659.
- Anonymous, 2002. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Communities Legislation* L220, 22-86.
- Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., Russo, A., 1997. The Adriatic Sea general circulation. Part I: Air-sea interactions and water mass structure. *Journal of physical oceanography* 27, 1492-1514.
- Bates, B.B., Garrison, D.L., Horner, R.A., 1998. Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, str. 267-292.
- Bates, S.S., Bird, C.J., Freitas, A.S.W.D., Foxall, R., Gilgan, M.W., Hanic, L.A., Johnson, J.E., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Rao, D.V.S., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 1203-1215.
- Bates, S.S., Le' ger, C., Smith, K.M., 1996. Domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* as a function of division rate in silicate-limited chemostat culture. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Seventh*

- International Conference on Toxic Phytoplankton. UNESCO, Sendai, Japan. str. 163-166.
- Bates, S.S., Trainer, V., 2006. The ecology of harmful diatoms. In: Granéli, E.a.J.T.T.E. (Ed.), Ecology of Harmful Algae. Springer-Verlag,, Berlin, str. 81-88.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2011. GenBank. Database issue. Nucleic Acids Research 39, D32–D37.
- Bérard-Therriault, L., Poulin, M., Bossé, L., 1999. Guide d'identification du phytoplankton marin de l'estuarie et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires. Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques, 387 str.
- Bernardi Aubry, F., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G., Acri, F., 2004. Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999). Continental Shelf Research 24, 97-115.
- Bernardi Aubry, F., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Cassin, D., Pugnetti, A., Socal, G., 2006. Seasonal and interannual variations of phytoplankton in the Gulf of Venice (Northern Adriatic Sea). Chemistry and Ecology 22, 71-91.
- Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V., Lee, R., 2008. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (Bacillariophyta) isolated from the Black Sea. Harmful Algae 7, 438-442.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermu' dez de la Puente, M., Salgado, C., 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. Aquatic Toxicology 60, 111-121.
- Bosak, S., Horvat, L., Pestorić, B., Krivokapić, S., 2010. Observations on *Pseudo-nitzschia* species in the Bay of Kotor, SE Adriatic Sea, 39th CIESM Congress. Rapport du Commission Internationale pour l' Exploration Scientifique de la Mer Mediterranee 39, Venice, str. 721.
- Burić, Z., Viličić, D., Mihalić, K.C., Carić, M., Kralj, K., Ljubešić, N., 2008. *Pseudo-nitzschia* blooms in the Zrmanja River estuary (Eastern Adriatic Sea). Diatom Research 23, 51-63.

- Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L., Albertano, P., 2005. On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Journal of Plankton Research* 27, 763-774.
- Casteleyn, G., Chepurnov, V.A., Leliaert, F., Mann, D.G., Bates, S.S., Lundholm, N., Rhodes, L., Sabbe, K., Vyverman, W., 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* 7, 241-257.
- Casteleyn, G., Adams, N.G., Vanormelingen, P., Debeer, A.E., Sabbe, K., Vyverman, W., 2009a. Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): Genetic and morphological evidence. *Protist* 160, 343-354.
- Casteleyn, G., Evans, K.M., Backeljau, T., D'Hondt, S., Chepurnov, V.A., Sabbe, K., Vyverman, W., 2009b. Lack of population genetic structuring in the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) in a heterogeneous area in the Southern Bight of the North Sea. *Marine Biology* 156, 1149-1158.
- Casteleyn, G., Leliaert, F., Backeljau, T., Debeer, A.E., Kotaki, Y., Rhodes, L., Lundholm, N., Sabbe, K., Vyverman, W., 2010. Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12952-12957.
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A., 2005. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4, 33-48.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L., Vyverman, W., 2005. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology* 40, 379-395.
- Churro, C.I., Carreira, C.C., Rodrigues, F.J., Craveiro, S.C., Calado, A.J., Casteleyn, G., Lundholm, N., 2009. Diversity and abundance of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Aveiro Coastal Lagoon, Portugal and description

- of a new variety. *P. pungens* var. *aveirensis* Var. nov. *Diatom Research* 24, 35-62.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Quilliam, M.A., Tubaro, A., Poletti, R., 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2030-2038.
- Civitarese, G., Gačić, M., Lipizer, M., Eusebi Borzelli, G.L., 2010. On the impact of the Bimodal Oscillating System (BiOS) on the biogeochemistry and biology of the Adriatic and Ionian Seas (Eastern Mediterranean). *Biogeosciences* 7, 3987-3997.
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Changes in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition Primer-E, Plymouth, 144 str.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- Conversi, A., Umani, S.F., Peluso, T., Molinero, J.C., Santojanni, A., Edwards, M., 2010. The mediterranean sea regime shift at the end of the 1980s, and intriguing parallelisms with other european basins. *PLoS ONE* 5(5).
- Cozzi, S., Giani, M., 2011. River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research* 31, 1881-1893.
- Cusack, C., Raine, R., Patching, J.W., 2004. Occurrence of species from the genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Irish waters. *Biology and Environment* 104, 55-74.
- Cusack, C.K., Bates, S.S., Quilliam, M.A., Patching, J.W., Raine, R., 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *Journal of Phycology* 38, 1106-1112.
- D'Alelio, D., D'Alcalà, M.R., Dubroca, L., Sarno, D., Zingone, A., Montresor, M., 2010. The time for sex: A biennial life cycle in a marine planktonic diatom. *Limnology and Oceanography* 55, 106-114.
- Davidovich, N.A., Bates, S.S., 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 34, 126-137.

- Degobbi, D., Precali, R., Ivančić, I., Smolaka, N., Fuks, D., Kveder, S., 2000. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *International Journal of Environment and Pollution* 13, 495-533.
- DeManche, J.M., Curl, H.C., Donaghay, P.L., Lundy, D.W., 1979. The rapid response of the marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in external and internal nutrient concentration. *Marine Biology* 53, 323-333.
- Douglas, D.J., Landry, D., Douglas, S.E., 1994. Genetic relatedness of toxic and nontoxic isolates of the marine pennate diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae): phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences. *Natural toxins* 2, 166-174.
- Douglas, D.J., Kenchington, E.R., Bird, C.J., Pocklington, R., Bradford, B., Silvert, W., 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 907-913.
- EFSA, 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-domoic acid. In: E.F.S.A. (Ed.). E.F.S.A.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G., 2007. An assessment of potential diatom "Barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349-364.
- Falk, M., Seto, P.F., Walter, J.A., 1991. Solubility of domoic acid in water and in nonaqueous solvents. *Canadian Journal of Chemistry* 69, 1740-1744.
- Fehling, J., Davidson, K., Bolch, C., Tett, P., 2006. Seasonality of *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) in western Scottish waters. *Marine Ecology Progress Series* 323, 91-105.
- Felsenstein, J., 1981. Continuous Genotype Models and Assortative Mating. *Theoretical Population Biology* 19, 341-357.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, ver. 3.4. *Cladistics* 5, 164-166.

- Felsenstein, J., 1993. Phylogeny Inference Package (version 3.5 c) Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Franco, P., Michelato, A., 1992. Northern Adriatic Sea: Oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. Science of the Total Environment (SUPPL.), 35-62.
- Frenguelli, J., 1938. Diatomeas de la Baha de san Blas. Rev. Mus. la Plata 1 (59 251, 337-taxonomy.
- Gačić, M., Poulain, P.M., Zore-Armanda, M.V.B., 2001. Physical Oceanography of the Adriatic Sea Kluwer Academic publishers, Dordrecht: .
- Gallacher, S., Howard, G., Hess, P., MacDonald, E., Kelly, M.C., Bates, L.A., Brown, N., MacKenzie, M., Gillibrand, P., Turrell, W.R., 2001. The occurrence of amnesic shellfish poisons in shellfish from Scottish waters. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, D. (Eds.), Harmful Algal Blooms 2000. Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms UNESCO, Hobart, Australia, str. 30-33.
- Garrison, D.L., Conrad, S.M., Eilers, P.P., Waldron, E.M., 1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. Journal of Phycology 28, 604-607.
- Gravel, D., Bell, T., Barbera, C., Bouvier, T., Pommier, T., Venail, P., Mouquet, N., 2011. Experimental niche evolution alters the strength of the diversity–productivity relationship. Nature 469, 89-92.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA, str. 29-60.
- Hallegraeff, G.M., 1994. Species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Australian waters. Botanica Marina 37, 397-411.
- Hansen, L.R., Soyulu, S.T., Kotaki, Y., Moestrup, T., Lundholm, N., 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. Harmful Algae 10, 689-696.
- Harding, L.W.J., Degobbi, D., Precali, R., 1999. Production and fate of phytoplankton: annual cycles and interannual variability. In: T.C. Malone, A. Malej, L.W.

- Harding, Jr, N. Smolaka, R.E. Turner (Eds.), Ecosystem at the Land-Sea Margin: Drainage Basin to Coastal Sea, str. 131-172.
- Hasle, G.R., 1964. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. I. Some marine species of the groups *Nitzschiella* and *Lanceolatae*. Skrifter av det Norske Videnskaps-Akademi I Oslo I Matematisk-Naturvidenskapeling Klasse 16, 1-48.
- Hasle, G.R., 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. Skrifter av det Norske Videnskaps-Akademi I Oslo I Matematisk-Naturvidenskapeling Klasse 18, 1-45.
- Hasle, G.R., 1971. *Nitzschia pungiformis* (Bacillariophyceae), a new species of the *Nitzschia seriata* group. Norwegian Journal of Botany 18, 139-144.
- Hasle, G.R., 1976. Examination of diatom type material, *Nitzschia delicatissima* Cleve, *Thalassiosira minuscola* Krasske and *Cyclotella nana* Hustedt. British Phycological Journal 11, 101-110.
- Hasle, G.R., 1994. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). Journal of Phycology 30, 1036-1039.
- Hasle, G.R., 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseries* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology and distribution. Journal of Phycology 31, 428-435.
- Hasle, G.R., Syversten, E.E., 1995. Marine Diatoms. In: Tomas, C.R. (Ed.), Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, London, str. 5-387.
- Hasle, G.R., 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? Harmful Algae 1, 137-146.
- Heiden, H., Kolbe, R.W., 1929. Die marinen Diatomeen der deutschen Südpolar Expedition, 1901-1903. In: von Drygalski, E. (Ed.), Deutsche Südpolar Expedition, 1901-1903. Walter de Gruyter and Co., Berlin and Leipzig, str. 447-715.
- Holland, P.T., McNabb, P., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Neil, T., 2003. Amnesic shellfish poisoning toxins in New Zealand shellfish - detection of a novel domoic acid isomer. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, str. 29-42.

- Holtermann, K.E., Bates, S.S., Trainer, V.L., Odell, A., Virginia Armbrust, E., 2010. Mass sexual reproduction in the toxigenic diatoms *Pseudo-nitzschia australis* and *P. pungens* (Bacillariophyceae) on the Washington coast, USA. *Journal of Phycology* 46, 41-52.
- Horner, R., 2002. A taxonomic guide to some common marine phytoplankton. Biopress Limited, Bristol. 195 str.
- Horner, R.A., Garrison, D.L., Plumley, F.G., 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. west coast. *Limnology and Oceanography* 42, 1076-1088.
- Hubbard, K.A., Rocap, G., Armbrust, E.V., 2008. Inter- and intraspecific community structure within the diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 44, 637-649.
- Hustedt, F., 1930. Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig, 920 str.
- Hustedt, F., 1959. Die Kieselalgen. Deutschlands, Österreichs und der Schweiz unter Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. 2. Teil, 845 str.
- Ibanez, F., Fromentin, J.M., Castel, J., 1993. Application de la méthode des sommes cumulées à l'analyse des séries chronologiques en océanographie. *C. R. Acad. Sci. Paris/Sciences de la Vie* 316, str. 745-748.
- Ivančić, I., Radić, T., Lyons, D.M., Fuks, D., Precali, R., Kraus, R., 2009. Alkaline phosphatase activity in relation to nutrient status in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 378, 27-35.
- Kaczmarska, I., Ehrman, J.M., Bates, S.S., Green, D.H., Leger, C., Harris, J., 2005a. Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4, 725-741.
- Kaczmarska, I., LeGresley, M.M., Martin, J.L., Ehrman, J., 2005b. Diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Quoddy Region of the Bay of Fundy, Canada. *Harmful Algae* 4, 1-19.
- Kaczmarska, I., Reid, C., Martin, J.L., Moniz, M.B.J., 2008. Morphological, biological, and molecular characteristics of the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* from the Canadian Maritimes. *Botany* 86, 763-772.

- Kamburska, L., Fonda-Umani, S., 2009. From seasonal to decadal inter-annual variability of mesozooplankton biomass in the Northern Adriatic Sea (Gulf of Trieste). *Journal of Marine Systems* 78, 490-504.
- Kotaki, Y., Furio, E.F., Satake, M., Lundholm, N., Katayama, T., Koike, K., Fulgueras, V.P., Bajarias, F.A., Takata, Y., Kobayashi, K., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M., 2005. Production of isodomoic acids A and B as major toxin components of a pennate diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Toxicon* 46, 946-953.
- Kudela, R.M., Roberts, A., Armstrong, M., 2004. Laboratory analysis of nutrient stress and toxin accumulation in *Pseudo-nitzschia* species from Monterey Bay, California In: Steidinger, K., Landsberg, J.H., Tomas, C., Vargo, G. (Eds.), *Florida Fish and Wildlife Conservation Commission. Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of Harmful Algae*. UNESCO, St. Petersburg, FL, USA, str. 136-138.
- Kumar, Y., Westram, R., Kipfer, P., Meier, H., Ludwig, W., 2006. Evaluation of sequence alignments and oligonucleotide probes with respect to three-dimensional structure of ribosomal RNA using ARB software package. *BMC Bioinformatics* 7:240, 1-11.
- Lagus, A., Suomela, J., Weithoff, G., Heikkilä, K., Helminen, H., Sipura, J., 2004. Species-specific differences in phytoplankton responses to N and P enrichments and the N:P ratio in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research* 26, 779-798.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., Bates, S.S., 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: Revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51, 168-216.
- Lim, H.C., Leaw, C.P., Su, S.N.P., Teng, S.T., Usup, G., Mohammad-Noor, N., Lundholm, N., Kotaki, Y., Lim, P.T., 2012. Morphology and molecular characterization of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from Malaysian Borneo, including the new species *Pseudo-nitzschia circumpora* sp. nov. *Journal of Phycology* 48, 1232-1247.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T.,

- Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32, 1363-1371.
- Ludwig, W., Dumont, E., Meybeck, M., Heussner, S., 2009. River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: Major drivers for ecosystem changes during past and future decades? *Progress in Oceanography* 80, 199-217.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, Ø., 1997. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36, 381-388.
- Lundholm, N., Daugbjerg, N., Moestrup, Ø., 2002a. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology* 37, 115-134.
- Lundholm, N., Hasle, G.R., Fryxell, G.A., Hargraves, P.E., 2002b. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia linea*. *Phycologia* 41, 480-497.
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., 2002. The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* sp. nov. (Bacillariophyceae): Morphology and phylogenetic relationships. *Phycologia* 41, 594-605.
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G.R., Hoef-Emden, K., 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology* 39, 797-813.
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P., 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology* 42, 464-481.
- Lundholm, N., Clarke, A., Ellegaard, M., 2010. A 100-year record of changing *Pseudo-nitzschia* species in a sill-fjord in Denmark related to nitrogen loading and temperature. *Harmful Algae* 9, 449-457.
- Lundholm, N., Bates, S.S., Baugh, K.A., Bill, B.D., Connell, L.B., Leger, C., Trainer, V.L., 2012. Cryptic and pseudocryptic diversity in diatoms-with descriptions of

- Pseudonitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. Journal of Phycology 48, 436-454.
- Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, Kralj K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P., Dakovac, T., 2011. Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). Harmful Algae 10, 713-722.
- Mackenzie, A.L., White, D.A., Sim, P.G., Holland, A.J., 1993. Domoic acid and the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*). Elsevier Science Publishers, str. 607-612.
- Mafrá, L.L., Bricelj, V.M., Fennel, K., 2010. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. Aquatic Toxicology 100, 17-29.
- Malej, A., Mozetič, P., Malačič, V., Turk, V., 1997. Response of summer phytoplankton to episodic meteorological events (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). P.S.Z.N.I: Marine Ecology 18, 273-288.
- Mann, D.G., Evans, K.M., 2007. Molecular genetics and the neglected art of diatomics. In: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), Unravelling the algae-the past, present and future of algal systematics. CRC Press, Boca Raton FL, str. 231-265.
- Marchetti, A., Trainer, V.L., Harrison, P.J., 2004. Environmental conditions and phytoplankton dynamics associated with *Pseudo-nitzschia* abundance and domoic acid in the Juan de Fuca eddy. Marine Ecology Progress Series 281, 1-12.
- Marić, D., Ljubešić, Z., Godrijan, J., Viličić, D., Ujević, I., Precali, R., 2011. Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). Estuarine Coastal and Shelf Science 92, 323-331.
- Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., Precali, R., 2012. Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. Estuarine, Coastal and Shelf Science 115, 98-112.

- Martin, J.L., Haya, K., Burridge, L.E., Wildish, D.J., 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima*- a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada Marine Ecology Progress Series 67, 177-182.
- McCarron, P., Emteborg, H., Nulty, C., Rundberget, T., Loader, J.I., Teipel, K., Miles, C.O., Quilliam, M.A., Hess, P., 2011. A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 1: Design and preparation. Analytical and Bioanalytical Chemistry 400, 821-833.
- McDonald, S.M., Sarno, D., Zingone, A., 2007. Identifying *Pseudo-nitzschia* species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. Harmful Algae 6, 849-860.
- Medlin, L.K., Kooistra, W.H.C.F., 2010. Methods to estimate the diversity in the marine photosynthetic protist community with illustrations from case studies: a review. Diversity 2, 973-1014.
- Moniz, M.B.J., Kaczmarek, I., 2010. Barcoding of Diatoms: Nuclear Encoded ITS Revisited. Protist 161, 7-34.
- Moschandreou, K.K., Nikolaidis, G., 2010. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters. Botanica Marina 53, 159-172.
- Moschandreou, K.K., Papaefthimiou, D., Katikou, P., Kalopesa, E., Panou, A., Nikolaidis, G., 2010. Morphology, phylogeny and toxin analysis of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) isolated from the Thermaikos Gulf, Greece. Phycologia 49, 260-273.
- Mozetič, P., Fonda Umani, S., Cataletto, B., Malej, A., 1998. Seasonal and inter-annual plankton variability in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). ICES Journal of Marine Science 55, 711-722.
- Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., Francé, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smolaka, N., Fonda Umani, S., 2010. Recent Trends Towards Oligotrophication of the Northern Adriatic: Evidence from Chlorophyll a Time Series. Estuaries and Coasts 33, 362-375.
- Mozetič, P., Francé, J., Kogovšek, T., Talaber, I., Malej, A., 2012. Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. Estuarine, Coastal and Shelf Science 115, 138-148.

- Novaczek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Johnson, G., Nijjar, M.S., Sims, D.E., 1991. Uptake, disposition and depuration of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 21, 103-118.
- Orlić, M., 1987. Oscillations of the inertia period on the Adriatic Sea shelf. *Continental Shelf Research* 7, 577-598.
- Orlić, M., Gačić, M., La Violette, P.E., 1992. The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanologica Acta* 15, 109-124.
- Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J., Montresor, M., 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *European Journal of Phycology* 37, 247-257.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D., Montresor, M., 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series* 271, 87-98.
- Pan, Y., Durvasula, V.S.R., Mann, K.H., 1996a. Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation. *Journal of Phycology* 32, 371-381.
- Pan, Y., Subba Rao, D.V., Mann, K.H., Li, W.K.W., Harrison, W.G., 1996b. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. II. Continuous culture studies. *Marine Ecology Progress Series* 131, 235-243.
- Parsons, M.L., Dortch, Q., 2002. Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnology and Oceanography* 47, 551-558.
- Penna, A., Casabianca, S., Perini, F., Bastianini, M., Riccardi, E., Pigozzi, S., Scardi, M., 2013. Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: Characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of Plankton Research* 35, 352-366.
- Peplies, J., Kottmann, R., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2008. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 251-257.

- Peragallo, H., Peragallo, M., 1900. Diatomée marines des France Grez-sur-Loing, str. 492.
- Perl, T.M., Bedard, L., Kosatshy, T., Hockin, J.C., Todd, E.C.D., Remis, R.S., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine* 322, 1775-1780.
- Powell, C.L., Ferdin, M.E., Busman, M., Kvitek, R.G., Doucette, G.J., 2002. Development of a protocol for determination of domoic acid in the sand crab (*Emerita analoga*): A possible new indicator species. *Toxicon* 40, 485-492.
- Priisholm, K., Moestrup, Ø., Lundholm, N., 2002. Taxonomic notes on the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the Andaman Sea near the island of Phuket, Thailand, with a description of *Pseudo-nitzschia micropora* sp. nov. *Diatom Research* 17, 153-175.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35, 1-9.
- Pucher-Petković, T., Marasović, I., 1980. Developpment des populations phytoplanctoniques caracteristiques pour un milieu eutrophise (Baie de Kaštela, Adriatique centrale). *Acta Adriatica* 21, 79-93.
- Pulido, O.M., 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs* 6, 180-219.
- Qi, Y., Ju, W., Lei, Z., 1994. The taxonomy and bloom ecology of *Pseudo-nitzschia* on the coasts of China, IOC-WESTPAC Third Internat. Scientific Symp., Bali, Indonesia, str. 88-95.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Flo, E., Fernandez-Tejedor, M., Diogène, J., Camp, J., 2008a. Bloom dynamics of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in two coastal bays (NW Mediterranean Sea). *Scientia Marina* 72, 577-590.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., Van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., Fortuño, J.M., Camp, J., 2008b. Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia species* (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Scientia Marina* 72, 343-359.

- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K.B., de la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J.M., Camp, J., 2010. *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: Characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 74, 395-410.
- Quijano-Scheggia, S.I., Garcés, E., Lundholm, N., Moestrup, Ø., Andree, K., Camp, J., 2009. Morphology, physiology, molecular phylogeny and sexual compatibility of the cryptic *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyta), including the description of *P. arenysensis* sp. nov. *Phycologia* 48, 492-509.
- Quilliam, M.A., Xie, M., Hardstoff, W.R., 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *Journal AOAC International* 78, 543-554.
- Raichich, F., 1996. On the fresh water balance of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems* 9, 305-319.
- Revelante, N., Gilmartin, M., 1976a. The effect of Po river discharge on phytoplankton dynamics in the Northern Adriatic Sea. *Marine Biology* 34, 259-271.
- Revelante, N., Gilmartin, M., 1976b. Temporal succession of phytoplankton in the northern adriatic. *Netherlands Journal of Sea Research* 10, 377-396.
- Revelante, N., Gilmartin, M., 1980. Microplankton diversity indices as indicators of eutrophication in the northern adriatic sea. *Hydrobiologia* 70, 277-286.
- Rhodes, L., Selwood, A., McNabb, P., Briggs, L., Adamson, J., van Ginkel, R., Laczka, O., 2006. Trace metal effects on the production of biotoxins by microalgae. *African Journal of Marine Science* 28, 393-397.
- Rodionov, S., 2004. A sequential algorithm for testing climate regime shifts. *Geophysical Research Letters* 31, p. L09204.
- Rodionov, S.N., Overland, J.E., 2005. Application of a sequential regime shift detection method to the Bering Sea. *ICES Journal of Marine Science* 62, 328-332.
- Romero, M.L.J., Kotaki, Y., Lundholm, N., Thoha, H., Ogawa, H., Relox, J.R., Terada, R., Takeda, S., Takata, Y., Haraguchi, K., Endo, T., Lim, P.T., Kodama, M., Fukuyo, Y., 2011. Unique amnesic shellfish toxin composition found in the South East Asian diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Harmful Algae* 10, 456-462.
- Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge, 747 str.

- Sarno, D., Dahlman, J., 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). Harmful Algae News 21, 5.
- Sarno, D., Zingone, A., Montresor, M., 2010. A massive and simultaneous sex event of two *Pseudo-nitzschia* species. Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 57, 248-255.
- Schiller, J., 1933. Dinoflagellatae (Peridineae) in monographischer Behandlung 1.Teil Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, str. 1-617.
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin III, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. Nature 403, 80-84.
- Sekula-Wood, E., Schnetzer, A., Benitez-Nelson, C.R., Anderson, C., Berelson, W.M., Brzezinski, M.A., Burns, J.M., Caron, D.A., Cetinic, I., Ferry, J.L., Fitzpatrick, E., Jones, B.H., Miller, P.E., Morton, S.L., Schaffner, R.A., Siegel, D.A., Thunell, R., 2009. Rapid downward transport of the neurotoxin domoic acid in coastal waters. Nature Geoscience 2, 272-275.
- Sekula-Wood, E., Benitez-Nelson, C., Morton, S., Anderson, C., Burrell, C., Thunell, R., 2011. *Pseudo-nitzschia* and domoic acid fluxes in Santa Barbara Basin (CA) from 1993 to 2008. Harmful Algae 10, 567-575.
- Smith, E.A., Papapanagiotou, E.P., Brown, N.A., Stobo, L.A., Gallacher, S., Shanks, A.M., 2006. Effect of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in king scallops (*Pecten maximus*). Harmful Algae 5, 9-19.
- Socal, G., Acri, F., Bastianini, M., Bernardi Aubry, F., Bianchi, F., Cassin, D., Coppola, J., De Lazzari, A., Bandelj, V., Cossarini, G., Solidoro, C., 2008. Hydrological and biogeochemical features of the Northern Adriatic Sea in the period 2003-2006. Marine Ecology 29, 449-468.
- Sournia, A., 1973. La production primaire planctonique en Méditerranée. Essai de mise à jour. Bulletin de l'Étude en Commun de la Méditerranée 5, 128.

- Sournia, A., 1986. Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées, Raphidophycées. In: Sournia, A. (Ed.), Atlas du phytoplancton marin. CNRS, Paris, 219 str.
- Spatharis, S., Danielidis, D.B., Tsirtsis, G., 2007. Recurrent *Pseudo-nitzschia calliantha* (Bacillariophyceae) and *Alexandrium insuetum* (Dinophyceae) winter blooms induced by agricultural runoff. Harmful Algae 6, 811-822.
- Stehr, C.M., Connell, L.B., Baugh, K.A., Bill, B.D., Adams, N.G., Trainer, V.L., 2002. Morphological, toxicological, and genetic differences among *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species in inland embayments and outer coastal waters of Washington State, USA. Journal of Phycology 38, 55-65.
- Stelfox-Widdicombe, C.E., Archer, S.D., Burkill, P.H., Stefels, J., 2004. Microzooplankton grazing in *Phaeocystis* and diatom-dominated waters in the southern North Sea in spring. Journal of Sea Research 51, 37-51.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. 167, 310 str.
- Supić, N., Orlić, M., Degobbis, D., 2000. Istrian Coastal Countercurrent and its Year-to-Year Variability. Estuarine, Coastal and Shelf Science 51, 385-397.
- Takano, H., 1995. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Takano) Takano, a new combination for the pennate diatom *Nitzschia multistriata* Takano. Diatom 10, 73-74.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. Genetics 132, 619-633.
- Thessen, A.E., Dortch, Q., Parsons, M.L., Morrison, W., 2005. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. Journal of Phycology 41, 21-29.
- Thessen, A.E., 2007. Taxonomy and ecophysiology of *Pseudo-nitzschia* in the Chesapeake Bay, Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of The University of Maryland at College Park University of Maryland, Maryland, 246 str.
- Thessen, A.E., Bowers, H.A., Stoecker, D.K., 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. Harmful Algae 8, 792-810.

- Thomas, K., Tremblay, M.-L., Walter, J.A., Quilliam, M.A., 2008. NRC CRM-DA-f, a certified calibration solution reference material for domoic acid. CRMP Technical Report CRM-DA-f-20071205.
- Throndsen, J., 1993. The planktonic marine flagellates. In: Tomas, C. (Ed.), *Marine Phytoplankton: A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids*. Academic Press, London str. 7-147.
- Trainer, V.L., Adams, N.G., Bill, B.D., Stehr, C.M., Wekell, J.C., Moeller, P., Busman, M., Woodruff, D., 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnology and Oceanography* 45, 1818-1833.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14, 271-300.
- Ujević, I., Ninčević Gladan, Z., Roje, R., Skejić, S., Arapov, J., Marasović, I., 2010. Domoic acid-a new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules* 15, 6835-6849.
- UNESCO, 1986. Progress on oceanographic tables and standards 1983-1986: Work and recommendations of the UNESCO/SCOR/ICES/IAPSO Joint Panel. UNESCO 50, Paris.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 9, 1-38.
- Viličić, D., Djakovac, T., Burić, Z., Bosak, S., 2009. Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Botanica Marina* 52, 291-305.
- Waldichuk, M., 1989. Amnesic shellfish poison. *Marine Pollution Bulletin* 20, 359-360.
- Wohlgemuth, G.D., Mann, K.H., Subba Rao, D.V., Pocklington, R., 1992. Dynamics of the phycotoxin domoic acid-accumulation and excretion in two commercially important bivalves. *Journal of Applied Phycology* 4, 297-310.
- Zanchettin, D., Traverso, P., Tomasino, M., 2008. Po River discharges: A preliminary analysis of a 200-year time series. *Climatic Change* 89, 411-433.

- Zavatarelli, M., Baretta, J.W., Baretta-Bekker, J.G., Pinardi, N., 2000. The dynamics of the Adriatic Sea ecosystem. An idealized model study. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 47, 937-970.
- Zimmermann, J., Jahn, R., Gemeinholzer, B., 2011. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity & Evolution* 11, 173-192.
- Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D., Sarno, D., 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5, 321-337.
- Zore-Armanda, M.V.B., 1963. Les masses d'eau de la mer Adriatique *Acta Adriatica* 10, 5-88.
- Zore-Armanda, M.V.B., 1969. Water exchange between the Adriatic and the Eastern Mediterranean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 16, 171-178.
- Zore, M., 1956. On the gradient currents in the Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 8(6), 1-38.

8. PRILOZI

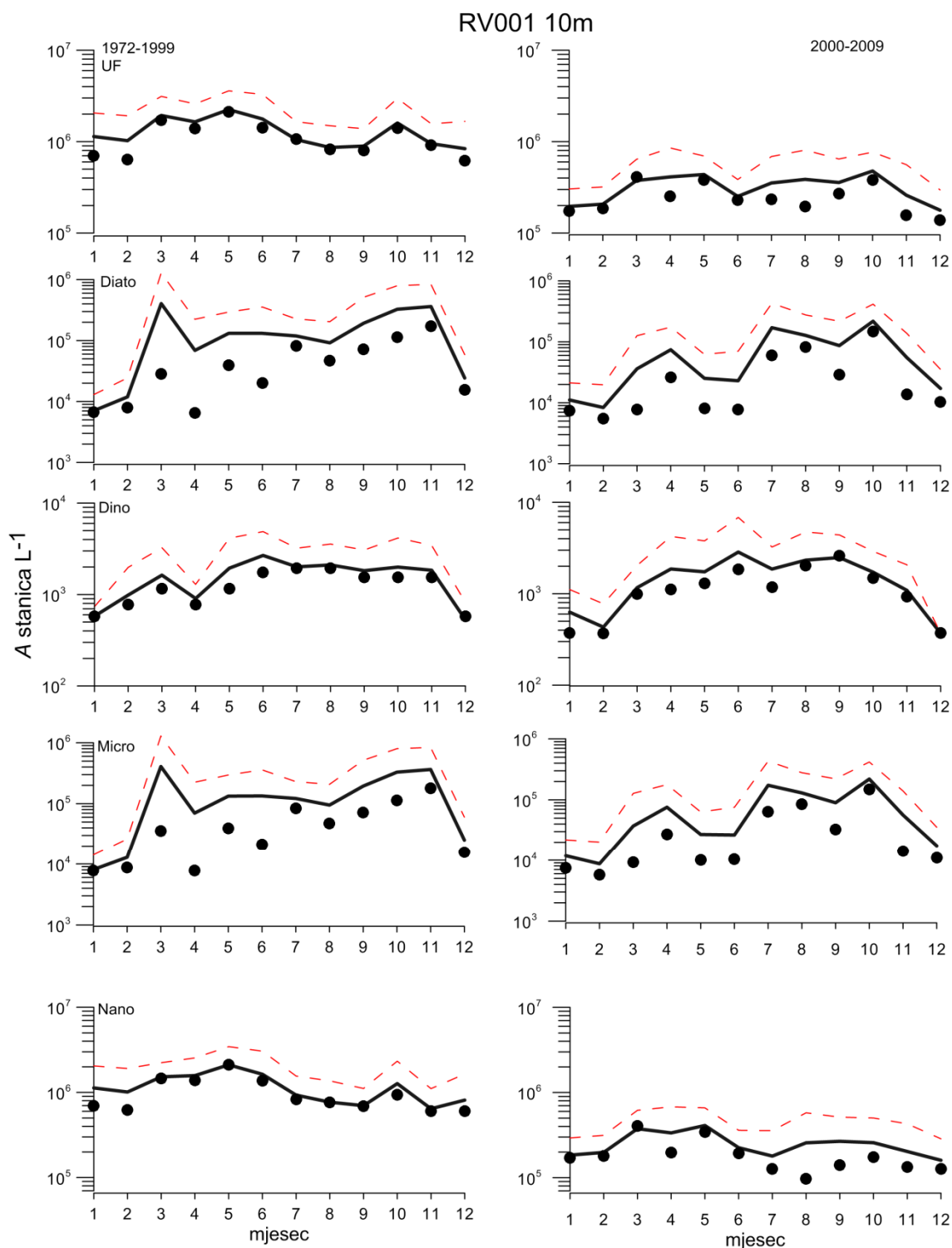
8 PRILOZI

Prilog 1. Tablica učestalosti uzorkovanja oceanografskih parametara i fitoplanktona. °Oceanografski podatci (temperatura, salinitet, hranjive soli) * fitoplankton na postaji RV001

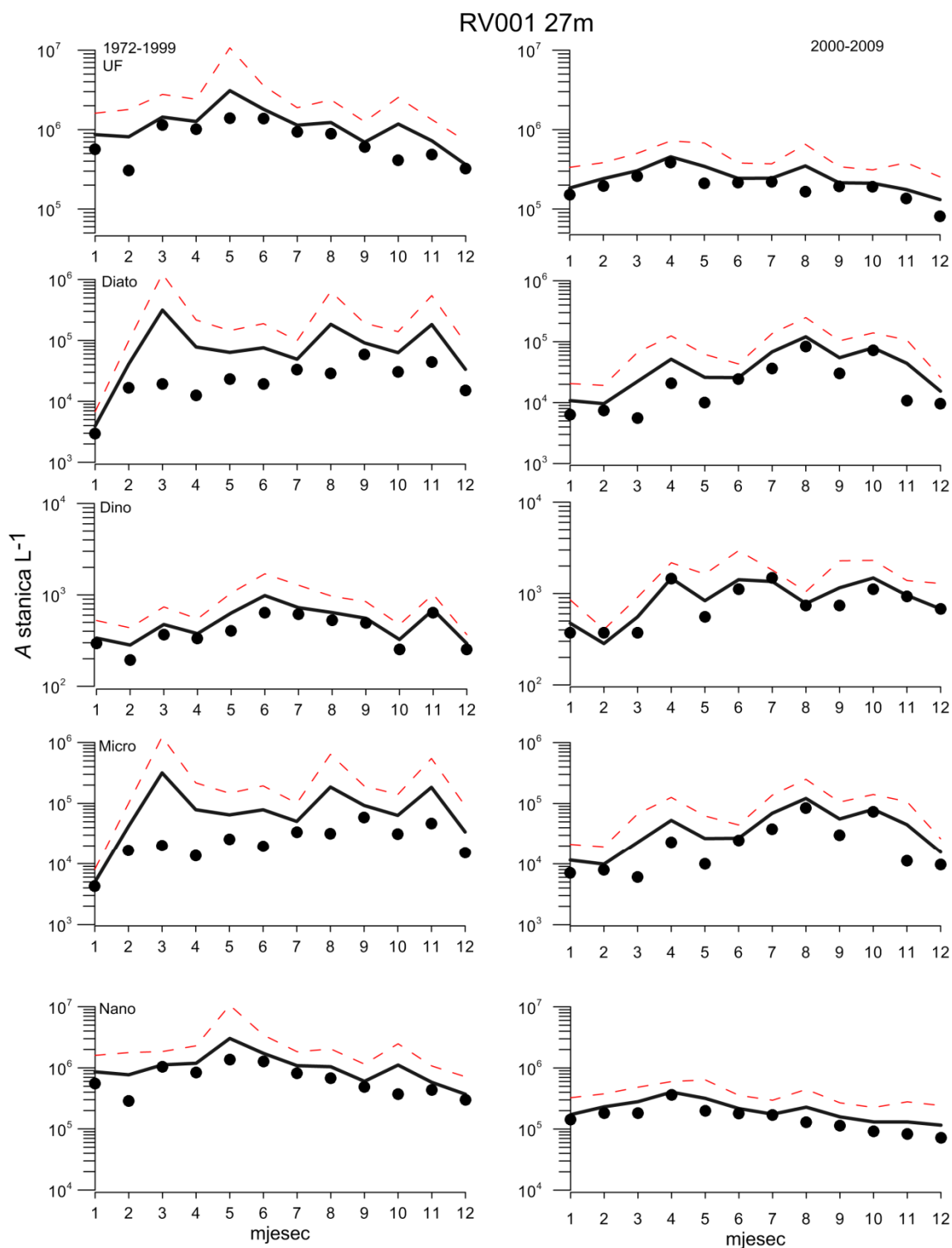
God.	Sij	Velj	Ožu	Tra	Svi	Lip	Srp	Kol	Ruj	Lis	Stu	Pro
1972	°*	°	°	°	°*	°*	°*	°	°*	°*	°*	°*
1973	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*		°*°*	°*	°*
1974	°		°	°	°	°	°	°		°	°	
1975		°			°				°			°
1976					°							
1977				°*		°*		°*	°*			°*
1978	°		°*	°*		°		°	°		°	°
1979			°	°	°		°	°	°		°	
1980	°	°	°						°*		°*	°*
1981		°*	°*		°*		°*					
1982		°*°*	°*	°*	°*		°*	°*	°*	°*	°*	
1983	°*		°*		°*			°*		°*		
1984			°*				°*	°*				
1985						°*	°*					°*
1986				°*			°*	°*		°	°	
1987		°	°*			°	°			°		°
1988							°	°*		°*		°*
1989			°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*
1990	°*	°*	°*°*	°*	°*°*	°*	°*		°*	°*		°*
1991	°*		°*	°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*		°*
1992	°*		°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
1993	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	
1994	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*		°*	°*
1995		°*	°*	°*		°*	°*	°*		°*	°*	
1996	°*		°*		°*	°*	°*	°*	°*			°*
1997	°*		°*		°*	°*	°*	°*	°*°*		°*	°*
1998		°*	°*		°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*
1999		°*		°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*
2000	°*	°*	°*	°*		°*	°*	°*°*	°*	°*°*		°*
2001		°*°*	°*		°*°*	°*	°*	°*	°*°*			°*
2002	°*		°*	°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*	
2003	°*	°*	°*		°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	
2004	°*	°*	°*		°*°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*
2005	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*°*	°*	°*°*	°*		°*
2006	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
2007	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*		°*
2008	°*	°*°*	°*	°*		°*°*	°*	°*	°*	°*		°*
2009	°*	°*	°*	°*		°*	°*	°*	°*	°*	°*	

Prilog 2. Tablica učestalosti uzorkovanja oceanografskih parametara i fitoplanktona. °Oceanografski podatci (temperatura, salinitet, hranjive soli) * fitoplankton na postaji SJ107

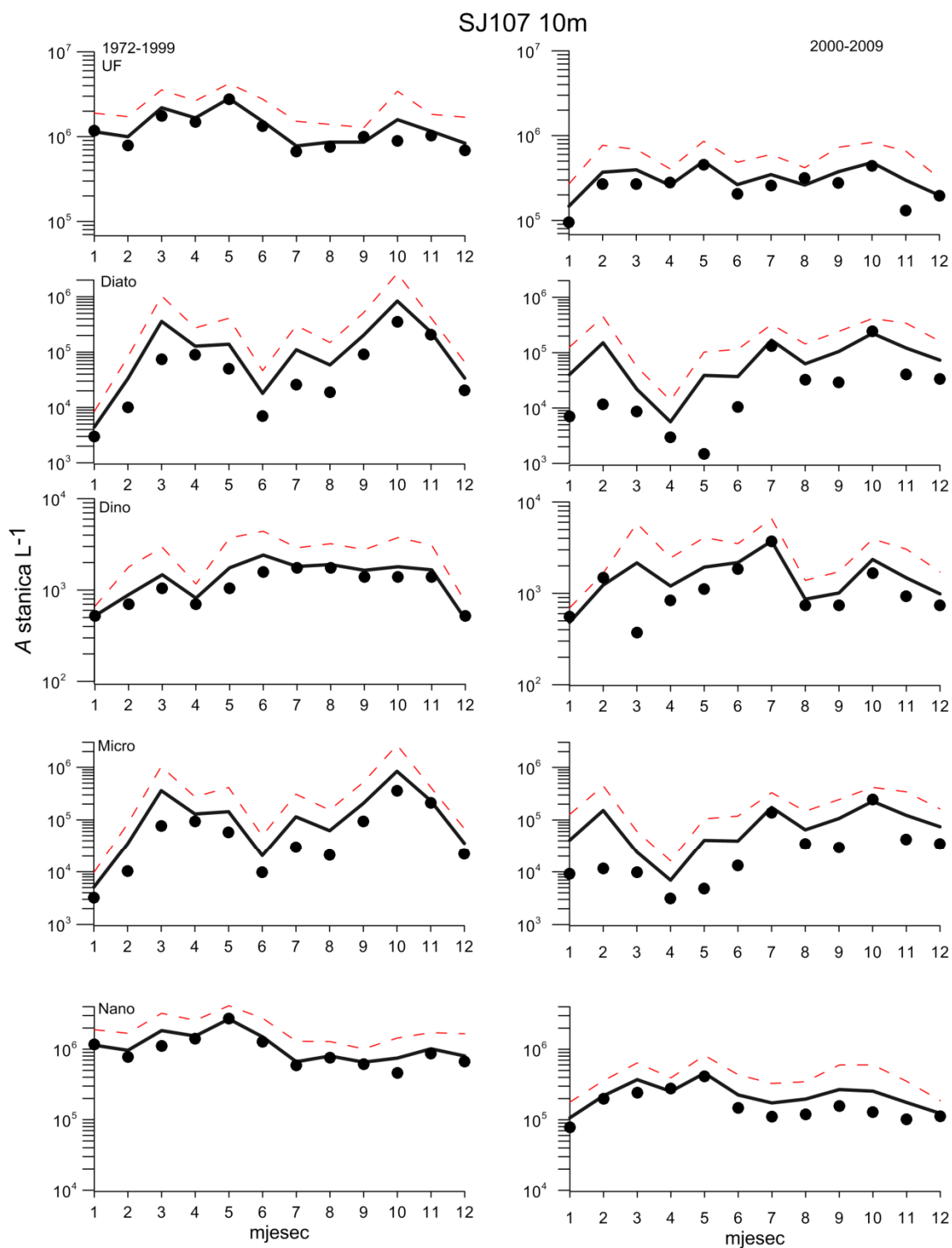
God.	Sij	Velj	Ožu	Tra	Svi	Lip	Srp	Kol	Ruj	Lis	Stu	Pro
1972	°	°	°		°	°*	°*	°	°	°	°	°
1973	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*		°*°*	°*	°*
1974	°	°	°	°	°	°	°*	°	°	°	°	°
1975	°	°*	°	°*	°		°		°			°
1976					°							
1977				°		°		°	°			°
1978			°*	°		°	°	°			°	°
1979				°	°		°	°	°	°	°*	
1980			°				°		°		°	°
1981		°	°*		°*		°*					
1982		°*°*	°*	°*	°*		°*°*	°*	°*	°*	°*	
1983	°*		°*		°*	°	°	°*		°*		
1984			°*				°*	°*				°*
1985						°*	°*	°*				°*
1986	°			°*	°*	°	°*	°*		°*		°*
1987		°*	°*			°*	°	°*				
1988					°*		°*°*	°*	°*	°*	°*	°*
1989	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*°*	°	°*	°
1990	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*
1991	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*
1992	°*	°	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
1993	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	
1994	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*		°*°*	°*
1995		°*	°*	°*		°*	°*	°*		°*	°*	
1996	°*		°*		°*	°*	°*	°*	°*			°*
1997	°*		°*				°*°*	°*	°*°*		°*	°*
1998		°*	°*		°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
1999		°*		°*	°*	°*°*	°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*
2000	°*	°*	°*	°*		°*°*	°*	°*°*	°*	°*		°*°*
2001		°*°*	°*		°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
2002	°*		°*	°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*	
2003	°*	°*	°*		°*	°*°*	°*	°	°	°*	°*	°*
2004	°*	°*	°*		°*°*	°*°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*
2005	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*°*	°*	°*°*	°*		°*
2006	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*
2007	°*	°*	°*	°*	°*	°*	°*°*	°*	°*	°*		°*
2008	°*	°*°*	°*	°*		°*°*	°*	°*	°*	°*		°*
2009	°*	°*	°*	°*		°*	°*	°*	°*	°*	°*	



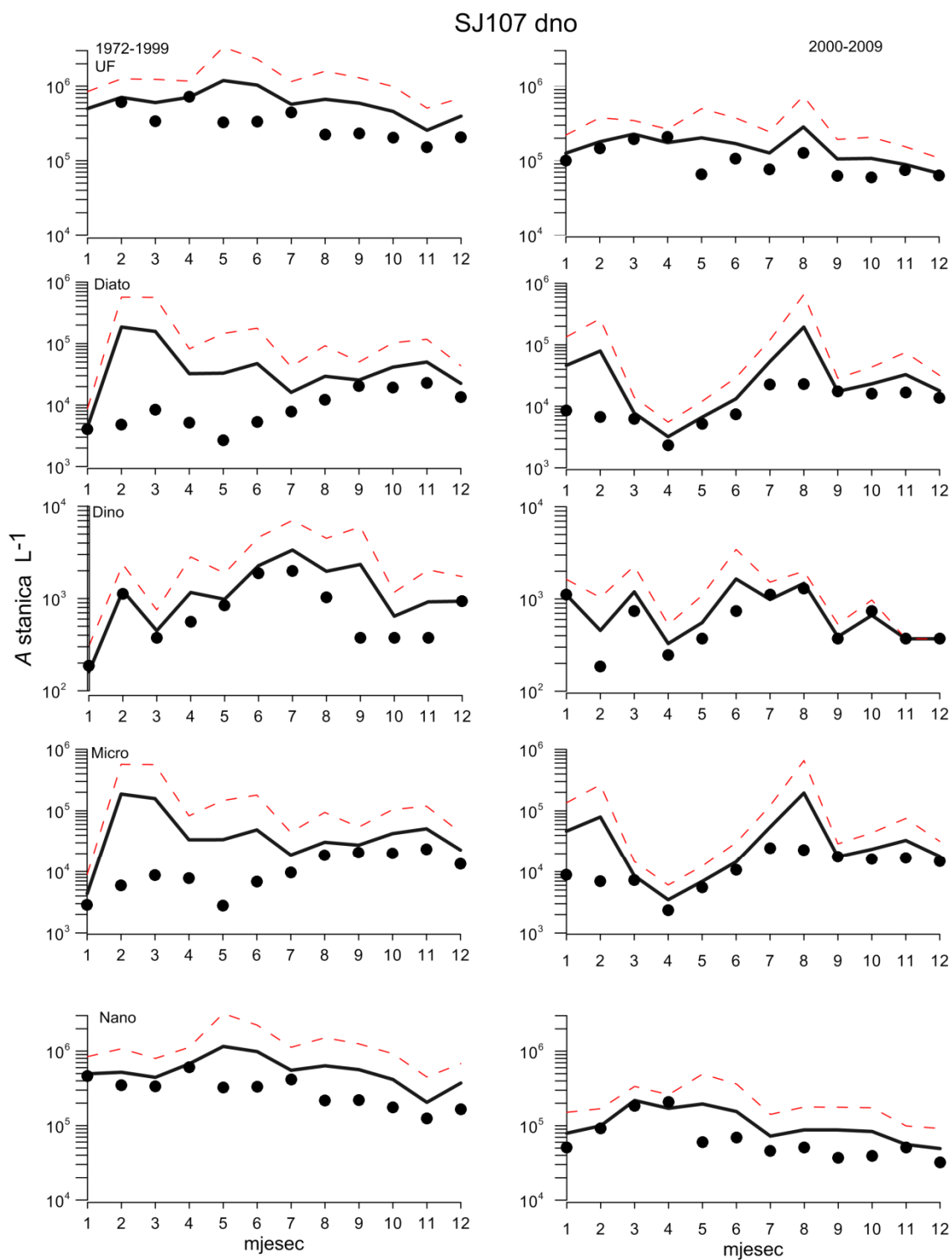
Prilog 3. Usporedba godišnje raspodjela površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (-), mediana (●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999 i od 2000-2009 na postaji RV001 na 10 metara dubine.



Prilog 4. Usporedba godišnje raspodjela površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (-), mediana (●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999 i od 2000-2009 na postaji RV001 na 27 metara dubine.



Prilog 5. Usporedba godišnje raspodjela površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (-), mediana (●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999 i od 2000-2009 na postaji SJ107 na 10 metara dubine.



Prilog 6. Usporedba godišnje raspodjela površinskih vrijednosti srednjih mjesečnih abundancija (-), mediana (●) i standardne devijacije (--) ukupnog fitoplanktona (UF), dijatomeja (Diato), dinoflagelata (Dino), mikroplanktona (Micro) i nanofitoplanktona (Nano) u dva istraživana razdoblja od 1972-1999 i od 2000-2009 na postaji SJ107 na 35 metara dubine.

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

9 ŽIVOTOPIS

Daniela Marić Pfannkuchen rođena je 1. travnja 1976. u Puli. U Poreču je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. 1995. upisala je studij biologije na Sveučilištu u Trstu. 2003. diplomirala je s diplomskim radom pod naslovom „Adattamento della macroalga rossa *Gracilaria longa* allo stress da cadmio: risposte fisiologiche, biochimiche ed ultrastrutturali“ (engl. "Analysis of red macro alga *Gracilaria longa* after cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural responses.") kod profesorice Laure Talarico.

Od 10.01.2005. zaposlena je kao stručni suradnik u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Poslijediplomski studij smjer Oceanologija upisala je 2006. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Od 10. srpnja 2007. zaposlena je kao znanstveni novak u Laboratoriju za procese u ekosustavu mora u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju gdje je izradila doktorsku disertaciju. Aktivno je radila na brojnim domaćim i stranim projektima.

Član je British Phycological Society i Hrvatskog biološkog društva.

Autor je i koautor 14 originalnih znanstvenih radova koje citira Current Contents, te brojnih priopćenja s domaćih i stranih znanstvenih skupova.

10 POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Originalni znanstveni radovi koje citira current contents:

1. Orlić, S., Najdek, M., Supić, N., Ivančić, I., Fuks, D., Blažina, M., Šilović, T., Paliaga, P., Godrijan, J., Marić, D. (2013) Structure and variability of microbial community at transect crossing a double gyre structure (north-eastern Adriatic Sea). Aquatic microbial ecology (prihvaćen za objavljivanje).
2. Viličić, D., Kuzmić, M., Tomažić, I., Ljubešić, Z., Bosak, S., Precali, R., Djakovac, T., Marić, D., Godrijan, J. (2013). Northern Adriatic phytoplankton response to short Po River discharge pulses during summer stratified conditions. Marine Ecology an Evolutionary Perspective. (prihvaćen za objavljivanje)
3. Marić, D., Frka, S., Godrijan, J., Tomažić, I., Penezić, A., Djakovac, T., Vojvodić, V., Precali, R., Gašparović, B. (2013) Organic matter production during late summer-winter period in a temperate sea, Continental shelf research, 55, 52-65. Doi: 10.1016/j.csr.2013.01.008
4. Godrijan, J., Marić, D., Tomažić, I., Precali, R., Pfannkuchen, M. (2012) Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. Journal of sea research 74, 1-13. Doi: 10.1016/j.seares.2012.09.009
5. Ivančić, I., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Marić, D., Gašparović, B., Djakovac, T., Najdek, M., (2012) Survival mechanisms of phytoplankton in conditions of stratification induced deprivation of orthophosphate: Northern Adriatic case study. Limnology and oceanography 57, 1721–1731. Doi:
6. Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić, D., Iveša, Lj., Kružić, P., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Godrijan, M. (2012) Toxin producing *Ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. Environmental science & technology 46, 5574-5582. Doi:10.1021/es300189h
7. Godrijan, J., Marić, D., Imešek, M., Janeković, I., Schweikert, M., Pfannkuchen, M. (2012) Diversity, occurrence, and habitats of the diatom genus *Bacteriastrum* (Bacillariophyta) in the northern Adriatic Sea, with the description of *B. jadranum* sp. nov. Botanica marina. 55, 415-426. Doi: 10.1515/bot-2011-0021
8. Fuks, D., Ivančić, I., Najdek, M., Lučić, D., Njire, J., Godrijan, J., Marić, D., Šilović, T., Paliaga, P., Blažina, M., Precali, R., Orlić, S. (2012) Changes in the planktonic community structure related to trophic conditions: the case study of the

northern Adriatic Sea. Journal of marine systems. 96/97, 95-102. Doi:10.1016/j.marsys.2012.02.006

9. Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Đakovac, T., Precali, R. (2012) Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. Estuarine, coastal and shelf science, 115, 98-112. Doi:10.1016/j.ecss.2012.02.003
10. Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Kralj Borojević, K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P. and Đakovac T. (2011). Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (northeastern Adriatic Sea). Harmful Algal Blooms, 10, 713-722. Doi: 10.1016/j.hal.2011.06.002
11. Frka, S., Gašparović, B., Marić, D., Godrijan, J., Djakovac, T., Vojvodić, V., Dautović, J., Kozarac, Z. (2011) Phytoplankton driven distribution of dissolved and particulate lipids in a semi-enclosed temperate sea (Mediterranean): Spring to summer situation. Estuarine, Coastal and Shelf Science 93, 290-304. Doi: 10.1016/j.ecss.2011.04.017
12. Marić, D., Ljubešić, Z., Godrijan, J., Viličić, D., Ujević, I., Precali, R. (2011): Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). Estuarine, Coastal and Shelf Science 92, 323-331. Doi:10.1016/j.ecss.2011.01.002
13. Pletikapić, G., Mišić Radić, T., Hozić Zimmermann, A., Svetličić, V., Pfannkuchen, M., Marić, D., Godrijan, J., Žutić, V. (2011): AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reiman & J.C. Lewin. Journal of molecular recognition. 24, 436-445. Doi: 10.1002/jmr.1114
14. Pfannkuchen, M., Marić, D., Godrijan, J., Fritz, G., Brummer, F., Jaklin, A., Hamer, B., Batel, R (2009): Sponges (Porifera) and eukaryotic, unicellular plankton. A case study on *Aplysina aerophoba*, Nardo 1886 in the Northern Adriatic. Journal of experimental marine biology and ecology. 382, 40-46. Doi: 10.1016/j.jembe.2009.09.016

Radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom:

1. Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić Pfannkuchen, D., Droege, G., Kusber, W.H., Zimmermann, J., Enke, N., Abarca, N., Jahn, R. (2013): Access to the planktonic biodiversity of the northern Adriatic. BioSyst. EU 2013 Global systematics! Abstract book. Kroh, A., Berning, B., Haring, E., Harzhauser, M.,

- Sattmann, H., Walochnik, J., Zimmermann, D., Zuschin, M., (eds.). - Vienna, Austria, 2013, 164-165.
2. Wolf, L., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić Pfannkuchen, D., Brümmer, F. (2013): Integrative taxonomy of marine organisms: A case study of diatoms and porifera. 3rd International Workshop "Research in Shallow Marine and Fresh Water Systems". Bremen, Njemačka, 2013.
 3. Marić, D., Godrijan, J., Kraus, R., Precali, R. (2011): Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influence in the northern Adriatic during last four decades. 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts. Travizi, A., Iveša, Lj., Fafandel, M.(eds.) Rovinj, 2011, 40.
 4. Marić, D., Godrijan, J., Ljubešić, Z., Pfannkuchen, M. (2011): Morphology, phylogeny and diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the northern Adriatic Sea. 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts. Travizi, A., Iveša, Lj., Fafandel, M. (eds.) Rovinj, 2011, 88.
 5. Godrijan, J., Bosak, S., Šilović, T., Marić, D., Pfannkuchen, M., Precali, R. (2011): Phytoplankton community dynamics in the coastal north-eastern Adriatic Sea. 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts. Travizi, A., Iveša, Lj., Fafandel, M. (eds.) Rovinj, 2011, 27.
 6. Godrijan, J., Young, J., Marić, D., Pfannkuchen, M. (2011): Coccolithophorida: Species diversity in the Northern Adriatic. 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts. Travizi, A., Iveša, Lj., Fafandel, M. (eds.) Rovinj, 2011, 79.
 7. Imešek, M., Pleše, B., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić, D., Četković, H. (2011): Sponges of the genus *Clathrina* from the northeastern Adriatic. 46th European Marine Biology Symposium Book of Abstracts. Travizi, A., Iveša, Lj., Fafandel, M. (eds.) Rovinj, 2011, 81.
 8. Marić, D., Godrijan, J., Kraus, R., Precali, R. (2010): Fluctuations in the abundance and composition of microphytoplankton off shore Rovinj (the northern Adriatic Sea) in the period 1972-2009. Variazioni temporali e tendenze nelle caratteristiche meteorologiche ed oceanografiche dell'Adriatico settentrionale: la situazione nel Golfo di Trieste, Giani, M. (Ed.). Trst, 2010, 25.
 9. Godrijan, J., Marić, D., Pfannkuchen, M., Đakovac, T., Degobbi, D., Precali, R. (2010): Phytoplankton community structure and succession along the eastern

- part of the northern Adriatic Sea. Rapp. Comm. int. Mer Médit., 39. CIESM-39th Congress, 2010, 367.
10. Marić, D., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Đakovac, T., Precali, R. (2010): Diversity and abundance patterns of phytoplankton in coastal waters of the northern Adriatic. Rapp. Comm. int. Mer Médit., 39. CIESM-39th Congress, 2010, 387.
 11. Marić, D., Godrijan, J., Ljubešić Z., Precali R. (2010): About the dangers of taking a closer look. The toxic species *Pseudo-nitzschia calliantha* discovered in the northern Adriatic. Abstract of the 4th Central European Diatom Meeting (4th CE-DIATOM), Kusber, W.-H. & Jahn, R. (Eds.): Botanic Garden and Botanic Museum Berlin-Dahlem, 2010, 37.
 12. Pfannkuchen, M., Marić, D., Godrijan, J., Precali, R., Jahn, R., Gemeinholzer, B., Zimmermann, J., Batel, R. (2009): A regularly occurring domination of *Skeletonema sp.* in the winter phytoplankton of the northern Adriatic Sea. How to resolve the species? Abstract of the 4th Central European Diatom Meeting (4th CE-DIATOM), Kusber, W.-H. and Jahn, R. (Eds.): Botanic Garden and Botanic Museum Berlin-Dahlem, 2010, 37.
 13. Godrijan, J., Marić, D., Pfannkuchen, M., Bosak, S., Đakovac, T., Degobbi, D., Precali, R. (2009): Coccolithophorid observation in the coastal Northern Adriatic Sea. Proceeding of abstracts of the 10th Croatian Biological Congress, 14th-20th September 2009 Osijek, V. Besendorfer, et al. (Eds.). Zagreb, 2009, 218-219.
 14. Marić, D., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Burić, Z., Jahn, R., Precali, R. (2009): Winter bloom of *Skeletonema costatum* 2009. Do we know what is actually blooming? Proceeding of abstracts of the 10th Croatian Biological Congress, 14th-20th September 2009 Osijek, V. Besendorfer, et al. (Eds.). Zagreb, 2009, 226-227.
 15. Pfannkuchen, M., Marić, D., Godrijan, J., Fritz, G., Brümmer, F., Jaklin, A., Hamer, B., Batel, R. (2009) How do sponges live? Recent insights from *Aplysina aerophoba* Nardo 1886. Proceeding of abstracts of the 10th Croatian Biological Congress, 14th-20th September 2009 Osijek, V. Besendorfer, et al. (Eds.). Zagreb, 2009, 162.
 16. Burić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Kralj, K., Marić, D., Peharec, P., Đakovac, T. (2009): Ecology and taxonomy of *Pseudo-nitzschia* in Lim Bay (northeastern Adriatic Sea). Diatom Taxonomy in the 21st Century, Programme and Abstracts,

- Scripta Botanica Belgica 45. Van de Vijver B., Cocquyt C. (eds.). National Botanic Garden of Belgium, Meise, 2009, 23.
17. Burić, Z., Bosak, S., Marić, D., Godrijan, J., Viličić, D., Kralj, K., Peharec, P. (2008): Taxonomical study of *Pseudo-nitzschia* species in the eastern Adriatic Sea. 20th International Diatom Symposium, Abstract Book, Jasprica, N., Car, A., Čalić, M. (Eds.). Dubrovnik: University of Dubrovnik, 2008, 115.
 18. Godrijan, J., Burić, Z., Marić, D., Bosak, S., Peharec, P., Đakovac, T. (2008): *Pseudo-nitzschia* and *Chaetoceros* bloom in the coastal waters of Istrian peninsula, Northern Adriatic Sea. 20th International Diatom Symposium Abstract Book, Jasprica, N., Car, A., Čalić, M. (Eds.). Dubrovnik: University of Dubrovnik, 2008, 137.
 19. Marić, D., Burić, Z., Godrijan, J., Bosak, S., Đakovac, T., Peharec, P. (2008): The occurrence of potentially toxic *Pseudo-nitzschia calliantha* in the coastal waters of the Northern Adriatic Sea. 20th International Diatom Symposium Abstract Book, Jasprica, N., Car, A., Čalić, M. (Eds.): University of Dubrovnik, 2008, 182.
 20. Kraus, R., Smodlaka, N., Degobbis, D., Precali, R., Đakovac, T., Godrijan, J., Marić, D. (2007): Phytoplankton in the northern Adriatic Sea from 1972 to 2006. Chapman Conference on Long Time-Series Observations in Coastal Ecosystems: Comparative Analyses of Phytoplankton Dynamics on Regional to Global Scales, Cloern, J. E. and Smodlaka, N. (Eds.). Rovinj, 2007, 44-45.
 21. Marić, D. (2006): Effects of cadmium on red Macroalgae *Gracilaria longa*. Book of Abstracts 9th Croatian Biological Congress with international participation. Besendorfer, V. Klobučar, G. I. V. (Eds.). Zagreb: Croatian Biological Society 1885, 2006, 437-438.